

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Commissioner
US Department of Commerce
United States Patent and Trademark
Office, PCT
2011 South Clark Place Room
CP2/5C24
Arlington, VA 22202
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 19 January 2001 (19.01.01)	
International application No. PCT/JP00/03764	Applicant's or agent's file reference OKT-101PCT
International filing date (day/month/year) 09 June 2000 (09.06.00)	Priority date (day/month/year) 10 June 1999 (10.06.99)
Applicant OKAMOTO, Hiroshi	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

17 November 2000 (17.11.00)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:2. The election ☒ was☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer

Maria Kirchner

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/03764

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N 15/09, C07K 14/435, C07K 16/18, C12N 1/15, C12N 1/21,
C12N 5/10, C12P 21/02, G01N 33/15, G01N 33/50, G01N 33/566,
A61K 31/00, A61K 38/00, A61K 45/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N 15/09, C07K 14/435, C07K 16/18, C12N 1/15, C12N 1/21,
C12N 5/10, C12P 21/02, G01N 33/15, G01N 33/50, G01N 33/566,
A61K 31/00, A61K 38/00, A61K 45/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DBJ/GeneSeq,
WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/A	Toshiyuki Saito et al., "Structure, chromosomal location, and expression profile of EXTR1 and EXTR2, new members of the multiple exostoses gene family", Biochemical and Biophysical Research Communications(1998), Vol.243, No.1, p.61-66	1-8, 14/ 9-13, 15, 16
X/A	Wim Van Hul et al., "Identification of a third EXT-like gene (EXTL3) belonging to the EXT gene family", Genomics(1998), Vol.47, No.2, p.230-237	1-8, 14/ 9-13, 15, 16
PX	Seiichi Kobayashi et al., "Identification of a receptor for Reg (Regenerating Gene) protein, a pancreatic β -Cell regeneration factor", The Journal of Biological Chemistry (April 14, 2000), Vol.275, No.15, p.10723-10726	1-16

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier document but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
08 September, 2000 (08.09.00)

Date of mailing of the international search report
19 September, 2000 (19.09.00)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

REC'D 17 AUG 2001

WIPO

PCT

国際予備審査報告


(法第12条、法施行規則第56条)
[PCT36条及びPCT規則70]

出願人又は代理人 の書類記号 OKT-101PCT	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知(様式PCT/ IPEA/416)を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JPO0/03764	国際出願日 (日.月.年) 09.06.00	優先日 (日.月.年) 10.06.99
国際特許分類(IPC) Int: C1' C12N15/09, C07K14/435, C07K16/18, C12N1/15, C12N1/21, C12N5/10, C12P21/02, G01N33/15, G01N33/50, G01N33/566, A61K31/00, A61K38/00, A61K45/00		
出願人(氏名又は名称) 岡本 宏		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条(PCT36条)の規定に従い送付する。
2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 5 ページからなる。
- ☐ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)
この附属書類は、全部で ページである。

3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。

- I ☒ 国際予備審査報告の基礎
- II ☐ 優先権
- III ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
- IV ☐ 発明の単一性の欠如
- V ☒ PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
- VI ☐ ある種の引用文献
- VII ☐ 国際出願の不備
- VIII ☒ 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 17.11.00	国際予備審査報告を作成した日 03.08.01	
名称及びあて先 日本国特許庁(IPEA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官(権限のある職員) 小暮 道明 印 	4B 9358
電話番号 03-3581-1101 内線 3448		

THIS PAGE BLANK (USPTO)

I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に
応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。
PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- ☐ 明細書 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
明細書 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
明細書 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 請求の範囲 第 _____ 項、 出願時に提出されたもの
請求の範囲 第 _____ 項、 PCT19条の規定に基づき補正されたもの
請求の範囲 第 _____ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
請求の範囲 第 _____ 項、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 図面 第 _____ ページ/図、 出願時に提出されたもの
図面 第 _____ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
図面 第 _____ ページ/図、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 _____ ページ
☐ 請求の範囲 第 _____ 項
☐ 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条（PCT35条(2)）に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性 (N)	請求の範囲	3-16	有
	請求の範囲	1, 2	無
進歩性 (IS)	請求の範囲	9-13, 15, 16	有
	請求の範囲	1-8, 14	無
産業上の利用可能性 (IA)	請求の範囲	1-16	有
	請求の範囲		無

2. 文献及び説明 (PCT規則70.7)

文献1: Toshiyuki Saito et al., "Structure, chromosomal location, and expression profile of EXTR1 and EXTR2, new members of the multiple exostoses gene family", Biochemical and Biophysical Research Communications(1998), Vol. 243, No. 1, p. 61-66

文献2: Wim Van Hul et al., "Identification of a third EXT-like gene (EXTL3) belonging to the EXT gene family", Genomics(1998), Vol. 47, No. 2, p. 230-237

・請求の範囲1、2について

上記文献1及び2には、本願明細書に記載された配列番号：4のアミノ酸配列と高い相同性を有するアミノ酸配列を有する蛋白質であるEXTR1及びEXTL3が、それぞれ記載されている。

ここで、上記蛋白質は、その相同性の高さからReg蛋白質と当然結合するものと認められるから、結局、本願請求の範囲1に記載された発明のうち、特に、(c)、(d)、(g)及び(h)に記載されたものと区別できないものである。

したがって、上記請求の範囲に記載された発明は新規性がない。

・請求の範囲3-8、14について

上記文献1及び2にそれぞれ記載されたEXTR1及びEXTL3をコードするDNAを取得すること、該DNAを挿入したベクターを用いて形質転換細胞を調製し、該蛋白質を製造すること、該蛋白質に対する抗体や該DNAに対するプローブを調製すること、該蛋白質を用いて何らかの化合物のスクリーニングを行うこと、並びに、何らかの薬剤として用いることは、本願優先日時の技術常識を考慮すると、当業者が容易になし得たものと認められる。

そして、上記請求の範囲に記載された発明の構成を採ることにより、格別顕著な効果を奏するものとも認められない。

したがって、上記請求の範囲に記載された発明は進歩性がない。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Ⅶ. 国際出願に対する意見

請求の範囲、明細書及び図面の明瞭性又は請求の範囲の明細書による十分な裏付についての意見を次に示す。

請求の範囲 10 に記載された「化合物」について、明細書中に具体的な記載はなく、また、本願出願時の技術常識を考慮しても、そのような化合物の取得には、当業者の過度の実験を要するものであるから、請求の範囲 10 に記載された発明は、明細書による十分な裏付けがないものと認められる。

同様の理由により、請求の範囲 14 - 16 に記載された発明は、明細書による十分な裏付けがないものと認められる。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

補充欄 (いずれかの欄の大きさが足りない場合に使用すること)

第 V.2. 欄の続き

・請求の範囲 9-13, 15, 16

上記文献1及び2には、本願発明のラットREG結合蛋白質に高い相同性を有するポリヌクレオチド及びポリペプチドが記載されている。しかし、該ポリペプチドの有する機能については、EXTファミリーであることを開示するのみで、REG結合蛋白であることを開示しているわけではない。そして、該EXTファミリーであるという開示のみに基づいて、上記文献1及び2に記載された配列情報から、例えば、配列番号：4で示されたアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドを取得することは、容易ではない。また、上記文献1及び2にそれぞれ記載された蛋白質がREG結合蛋白質であることを利用してスクリーニング等を行うことも容易ではない。

したがって、上記請求の範囲に記載された発明は、上記文献1及び2の記載に対して、進歩性を有するものである。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)
〔PCT18条、PCT規則43、44〕

出願人又は代理人 の書類記号 OKT-101PCT	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220)及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP00/03764	国際出願日 (日.月.年) 09.06.00	優先日 (日.月.年) 10.06.99
出願人(氏名又は名称) 岡本 宏		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 _____ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl¹ C12N 15/09, C07K 14/435, C07K 16/18, C12N 1/15, C12N 1/21,
C12N 5/10, C12P 21/02, G01N 33/15, G01N 33/50, G01N 33/566,
A61K 31/00, A61K 38/00, A61K 45/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl¹ C12N 15/09, C07K 14/435, C07K 16/18, C12N 1/15, C12N 1/21,
C12N 5/10, C12P 21/02, G01N 33/15, G01N 33/50, G01N 33/566,
A61K 31/00, A61K 38/00, A61K 45/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq,
WPI(DIALOG), BIOSIS(DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/A	Toshiyuki Saito et al., "Structure, chromosomal location, and expression profile of EXTR1 and EXTR2, new members of the multiple exostoses gene family", Biochemical and Biophysical Research Communications(1998), Vol.243, No.1, p.61-66	1-8, 14/ 9-13, 15, 16
X/A	Wim Van Hul et al., "Identification of a third EXT-like gene (EXTL3) belonging to the EXT gene family", Genomics(1998), Vol.47, No.2, p.230-237	1-8, 14/ 9-13, 15, 16

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

08.09.00

国際調査報告の発送日

19.09.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

小暮 道明

4B

9358

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

THIS PAGE BLANK (USPTO)

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P X	Seiichi Kobayashi et al., "Identification of a receptor for Reg (Regenerating Gene) protein, a pancreatic β -Cell re-generation factor", The Journal of Biological Chemistry (April 14, 2000), Vol. 275 , No. 15 , p. 10723-10726	1 - 16

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

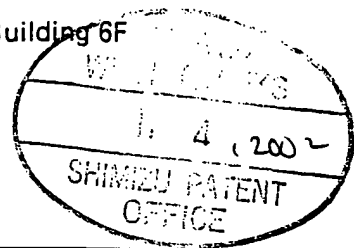
NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF COPIES OF TRANSLATION OF THE INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Rule 72.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

SHIMIZU, Hatsushi
Kantetsu Tsukuba Building 6F
1-1-1, Oroshi-machi
Tsuchiura-shi
Ibaraki 300-0847
JAPON



Date of mailing (day/month/year) 11 December 2001 (11.12.01)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference OKT-101PCT	
International application No. PCT/JP00/03764	International filing date (day/month/year) 09 June 2000 (09.06.00)
Applicant OKAMOTO, Hiroshi	

1. Transmittal of the translation to the applicant.

The International Bureau transmits herewith a copy of the English translation made by the International Bureau of the international preliminary examination report established by the International Preliminary Examining Authority.

2. Transmittal of the copy of the translation to the elected Offices.

The International Bureau notifies the applicant that copies of that translation have been transmitted to the following elected Offices requiring such translation:

EP,AT,AU,CA,CH,CN,CZ,FI,NO,NZ,RO,RU,SK,US

The following elected Offices, having waived the requirement for such a transmittal at this time, will receive copies of that translation from the International Bureau only upon their request:

AP,EA,AE,AG,AL,AM,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,CR,CU,DE,DK,DM,DZ,EE,ES,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU, ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,PL,PT,SD, SE,SG,SI,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,UZ,VN,YU,ZA,ZW,OA

3. Reminder regarding translation into (one of) the official language(s) of the elected Office(s).

The applicant is reminded that, where a translation of the international application must be furnished to an elected Office, that translation must contain a translation of any annexes to the international preliminary examination report.

It is the applicant's responsibility to prepare and furnish such translation directly to each elected Office concerned (Rule 74.1). See Volume II of the PCT Applicant's Guide for further details.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Eliott PERETTI
Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Telephone No. (41-22) 338.83.38

111
Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference OKT-101PCT	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP00/03764	International filing date (day/month/year) 09 June 2000 (09.06.00)	Priority date (day/month/year) 10 June 1999 (10.06.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15/09, C07K 14/435, 16/18, C12N 1/15, 1/21, 5/10, C12P 21/02, G01N 33/15, 33/50, 33/566, A61K 31/00, 38/00, 45/00		
Applicant OKAMOTO, Hiroshi		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of <u>5</u> sheets, including this cover sheet.
<input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT). These annexes consist of a total of _____ sheets.
3. This report contains indications relating to the following items: <ul style="list-style-type: none"> I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report II <input type="checkbox"/> Priority III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application VIII <input checked="" type="checkbox"/> Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 17 November 2000 (17.11.00)	Date of completion of this report 03 August 2001 (03.08.2001)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

I. Basis of the report

1. With regard to the elements of the international application:*

- ☒ the international application as originally filed
- ☐ the description:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the claims:
pages _____, as originally filed
pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the drawings:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the sequence listing part of the description:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☒ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☒ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	3-16	YES
	Claims	1, 2	NO
Inventive step (IS)	Claims	9-13, 15, 16	YES
	Claims	1-8, 14	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-16	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

Document 1: Toshiyuki Saito et al., "Structure, chromosomal location and expression profile of EXTR1 and EXTR2, new members of the multiple exostoses gene family", Biochem. Biophys. Res. Comm. (1998), Vol. 243, No. 1, pp. 61-66

Document 2: Wim Van Hul et al., "Identification of a third EXT-like gene (EXTL3) belonging to the EXT gene family", Genomics (1998), Vol. 47, No. 2, pp. 230-237

Claims 1 and 2

Documents 1 and 2 respectively disclose EXTR1 and EXTL3, which are proteins showing high homology with the amino acid sequence in SEQ ID NO:4 presented in the description of the present application.

On account of their high homology, the aforementioned proteins will naturally bind to Reg protein, and consequently they cannot be distinguished from DNA described in the invention set forth in Claim 1, particularly in (c), (d), (g) and (h).

Therefore, the inventions set forth in the aforementioned claims are not novel.

Claims 3-8 and 14

Given the state of the art at the priority date of the present application, a person skilled in the art could easily isolate DNA coding EXTR1 or EXTL3, disclosed in Document 1 and 2 respectively, prepare cells transformed using a vector into which said DNA had been inserted to produce said protein, prepare an antibody against said protein or a probe for said DNA, screen compounds using said protein and apply said proteins, etc., as pharmaceuticals.

Moreover, the adoption of the constitution of the inventions described in the above claims does not offer any surprising advantageous effect.

Therefore, the above claims do not involve an inventive step.

Claims 9-13, 15 and 16

Documents 1 and 2 disclose polynucleotides and polypeptides having high homology with the rat REG-binding protein of the inventions in the present application. However, the only function disclosed for said polypeptides is as members of the EXT family; they are not disclosed as REG-binding proteins, so that a person skilled in the art would not readily isolate a polynucleotide coding the amino acid sequence indicated by SEQ ID NO:4, for example, from the sequence information disclosed in Documents 1 and 2 based merely on the disclosure of said EXT family. A person skilled in the art could also not readily apply the proteins disclosed in Documents 1 and 2 for screening, etc., using the fact that they are REG-binding proteins.

Therefore, the inventions set forth in the above claims involve an inventive step relative to Documents 1 and 2.

VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

The description does not present any specific examples of the "compounds" described in Claim 10, and given the state of the art at the time of filing the present application the isolation of such compounds would require excessive experimentation of a person skilled in the art. Therefore, the invention as set forth in Claim 10 is not fully supported by the description.

For the same reason, the inventions set forth in Claims 14-16 are also not fully supported in the description.

不利にならない開示又は新規
性喪失の例外に関する陳述

(1) 開示の日 14.04.00
開示の種類 刊行物発表
Publication
刊行物の名称 The Journal of Biological
Chemistry, Vol. 275, No. 15, 10723-10726

(2) 開示の日 14.04.00
開示の種類 電子的技術情報
Electronc Technical
Information
情報の名称 The Journal of Biological
Chemistry

THIS PAGE BLANK (USPTO)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2000年12月21日 (21.12.2000)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 00/77192 A1

- (51) 国際特許分類: C12N 15/09, C07K 14/435, 16/18, C12N 1/15, 1/21, 5/10, C12P 21/02, G01N 33/15, 33/50, 33/566, A61K 31/00, 38/00, 45/00
- (74) 代理人: 清水初志, 外(SHIMIZU, Hatsushi et al.); 〒300-0847 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP00/03764
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (22) 国際出願日: 2000年6月9日 (09.06.2000)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願平11/164488 1999年6月10日 (10.06.1999) JP
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (71) 出願人 および
(72) 発明者: 岡本 宏 (OKAMOTO, Hiroshi) [JP/JP]; 〒980-0874 宮城県仙台市青葉区角五郎2-15-3-205 Miyagi (JP).

[続葉有]

(54) Title: REG-BINDING PROTEIN

(54) 発明の名称: Reg結合蛋白質

(57) Abstract: A protein binding to Reg protein is successfully cloned from cDNA originating in rat Langerhans islet. When expressed on the COS cell surface, this protein specifically binds to Reg protein. When the Reg-binding protein is expressed in RINm5F β cells, DNA synthesis and cell proliferation are stimulated depending on the dose of the Reg protein added to the medium. At a higher concentration, apoptosis is induced. It is considered that the above protein functions as a Reg receptor expressed on the surface of cells such as β cells and regulates the proliferation of these cells. This protein and its gene are useful in developing novel remedies for diabetes.

(57) 要約:

ラット膵ランゲルハンス島由来cDNAからReg蛋白質に結合する蛋白質をクローニングすることに成功した。COS細胞の細胞表面に発現させた該蛋白質は、Reg蛋白質と特異的に結合することが判明した。Reg結合蛋白質をRINm5F β 細胞で発現させたところ、培地に添加したReg蛋白質の用量依存的にDNA合成および細胞の増殖が刺激され、より高濃度においてはアポトーシスを誘導した。該蛋白質は、 β 細胞などの細胞表面に発現するReg受容体として機能しており、これらの細胞の細胞増殖を制御していると考えられる。該蛋白質やその遺伝子は、糖尿病の新しい治療薬開発のために有用である。

WO 00/77192 A1



添付公開 類:

— 国際調査報告

— 不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する
陳述。

2文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

明細書

Reg 結合蛋白質

技術分野

本発明は、Reg蛋白質に結合する新規な蛋白質およびその遺伝子、並びにこれらの製造および用途に関する。

背景技術

膵ランゲルハンス島 β 細胞は生体における唯一の血糖降下因子インスリンを産生する。従来、膵 β 細胞は一旦傷害され細胞数が減少すると容易に再生増殖しないと考えられ、これが糖尿病発症の重要な要因であり、同時に原因に基づく根本的な糖尿病治療が出来ない理由とされてきた。

従来、糖尿病治療はインスリンの投与、またはスルホニルウレア系の経口糖尿病薬が投与される。しかしインスリン投与は対症療法であり、同時に生理的血中インスリン濃度を維持することが難しく、さらに、動脈硬化症、神経障害、眼病変を進行させるなど、糖尿病の合併症治療を考えた場合にはその治療には限界があった。また経口糖尿病薬は副作用として長期投与における冠動脈硬化症や膵臓への過剰な負荷によると思われるインスリン分泌能の低下などの副作用があった。

本発明者らはこれまでに β 細胞障害およびその予防のメカニズムを解析してきた (H. Yamamoto, et al., Nature 294, 284 (1981); Y. Uchigata, et al., J. Biol. Chem. 257, 6084 (1982); Y. Uchigata, et al., Diabetes 32, 316 (1983); H. Okamoto, Bioessays 2, 15 (1985); H. Okamoto, J. Mol. Med. 77, 74 (1999))。さらに本発明者らは、実験的に膵 β 細胞を再生増殖させることに成功し (T. Watanabe et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 3589 (1994); Yonemura, Y.

et al. (1984) Diabetes 33, 401-404)、再生時に特異的に発現する遺伝子を単離してReg(Regenerating gene)と命名した(H. Okamoto, J. Mol. Med. 77, 74 (1999); K. Terazono, et al., J. Biol. Chem. 263, 2111 (1988); K. Terazono, T. Watanabe, Y. Yonemura, in Molecular biology of the islets of Langerhans, H. Okamoto, Ed. (Cambridge University Press, Cambridge, 1990), pp. 301-313; K. Terazono et al., Diabetologia 33, 250 (1990); T. Watanabe et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 3589 (1994))。また、Reg遺伝子産物であるReg蛋白質が膵 β 細胞の再生増殖因子であることを明らかにし、糖尿病モデル動物を用いた実験から、Reg蛋白質投与やReg遺伝子の活性化、さらにはReg遺伝子導入による糖尿病治療の可能性を示した(Watanabe, T. et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 3589-3592; Gross, D.J. et al. (1998) Endocrinology 139, 2369-2374; Okamoto, H. (1999) J. Mol. Med. 77, 74-79)。これらの解析から、Reg蛋白質を投与すると β 細胞の再生および増殖が誘導され、それによって β 細胞の量が増え、90%膵切除ラットおよび非肥満糖尿病マウスの糖尿病が寛解することが知られている。しかしながら、Reg蛋白質がどのような蛋白質と相互作用することにより機能を発揮しているのかについては不明であった。

Reg蛋白質はインスリン投与の弱点を補う膵臓 β 細胞の増殖因子として糖尿病治療への応用が期待されるが、分子量が大きく、経口投与が難しいことや、さらに高分子蛋白質の生体内におけるターゲティングが困難であるなど、臨床応用には数多くの技術的課題が存在する。

発明の開示

本発明は、Reg蛋白質に結合する新規な蛋白質およびその遺伝子、並びにそれらの製造方法および用途を提供することを課題とする。特に本発明の蛋白質は、糖尿病に対する新しい治療薬の開発に有用である。

本発明者は、膵 β 細胞系細胞に対するReg蛋白質の作用を調べるため、酵母を用

いて製造した組換えReg蛋白質を、ラットインスリノーマ細胞由来細胞株RINm5Fに添加する実験を行った。その結果、Reg蛋白質添加によりRINm5F細胞の5'-ブromo-2'-デオキシウリジン (BrdU) の取り込みは有意に増加し、該細胞はReg蛋白質により増殖が促進されることが判明した。次に本発明者は、Reg蛋白質を¹²⁵Iで標識し、RINm5F細胞に添加してその結合活性を調べた。その結果、Reg蛋白質の濃度依存的なRINm5F細胞への結合が観察され、その結合は過剰量の非標識Reg蛋白質により阻害されることから特異的なものと考えられた。これらの結果は、膵β細胞にはReg蛋白質受容体が発現しており、Reg蛋白質の結合により細胞増殖が促進されることを示唆している。

本発明者は、Reg蛋白質受容体として機能するReg結合蛋白質を単離するため、ラット膵ランゲルハンス島 polyA(+) RNAからファージベクターによる発現cDNAライブラリーを構築し、標識したReg蛋白質を用いたウェストウェスタン法によりReg結合蛋白質をコードする遺伝子のスクリーニングを行った。その結果、364アミノ酸からなる蛋白質をコードする新規なcDNAを単離することに成功した。このcDNAを哺乳動物細胞発現ベクターに挿入し、COS-7細胞で発現させ、組換えReg蛋白質をこの細胞に添加したところ、Reg蛋白質はこのCOS-7細胞に特異的に結合することが確かめられた。

本発明者は、このcDNAをプローブにラット膵ランゲルハンス島cDNAライブラリーをスクリーニングすることにより、Reg結合蛋白質をコードするcDNAをさらに単離することに成功した。当該cDNAは919アミノ酸からなる細胞表面蛋白質をコードしていた。このcDNAを哺乳動物細胞で発現させると、蛋白質は細胞表面に発現し、細胞はReg蛋白質と高い親和性で結合した。このcDNAによるトランスフェクションを受けたRINm5Fβ細胞は、Reg蛋白質の添加によりBrdUの取り込みが誘導され、細胞数が増加した。これらの結果から、単離されたcDNAがコードするReg結合蛋白質はReg蛋白質の受容体であり、膵β細胞においてReg蛋白質による細胞増殖シグナルを媒介していることが示された。また、このReg結合蛋白質を高発現する

RINm5F細胞は、高濃度のReg蛋白質を添加するとアポトーシスが誘導されることが判明した。

これらの事実から、このReg結合蛋白質はReg蛋白質のシグナルを伝達し、膵 β 細胞などにおいて細胞増殖等を制御することにより膵 β 細胞等の量（mass）を調節していると考えられる。本発明のReg結合蛋白質やその遺伝子は、糖尿病の病因メカニズムを解明するための有用なツールとなり、また、糖尿病治療薬開発への応用も可能であると考えられる。

本発明は、Reg蛋白質結合蛋白質およびその遺伝子、並びにそれらの製造方法および用途に関し、より具体的には、

（１）下記（a）から（i）のいずれかに記載のDNA、

（a）配列番号：２に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質をコードするDNA、

（b）配列番号：１に記載の塩基配列のコード領域を含むDNA、

（c）配列番号：２に記載のアミノ酸配列において１若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸配列からなり、Reg蛋白質と結合する活性を有する蛋白質をコードするDNA、

（d）配列番号：１に記載の塩基配列からなるDNAとハイブリダイズするDNAであって、Reg蛋白質と結合する活性を有する蛋白質をコードするDNA、

（e）配列番号：４に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質をコードするDNA、

（f）配列番号：３に記載の塩基配列のコード領域を含むDNA、

（g）配列番号：４に記載のアミノ酸配列において１若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸配列からなり、Reg蛋白質と結合する活性を有する蛋白質をコードするDNA、

（h）配列番号：３に記載の塩基配列からなるDNAとハイブリダイズするDNAであって、Reg蛋白質と結合する活性を有する蛋白質をコードするDNA、

（i）配列番号：２または４に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質の部分ペプチドをコードするDNA、

- (2) (1) に記載のDNAによりコードされる蛋白質またはペプチド、
- (3) (1) に記載のDNAが挿入されたベクター、
- (4) (3) に記載のベクターを保持する宿主細胞、
- (5) (4) に記載の宿主細胞を培養し、該細胞で発現した組み換え蛋白質を、該培養細胞またはその培養上清から回収する工程を含む、(2) に記載の蛋白質またはペプチドの製造方法、
- (6) (2) に記載の蛋白質またはペプチドに対する抗体、
- (7) 配列番号：1 または 3 に記載の塩基配列からなるDNAまたはその相補DNAとハイブリダイズし、少なくとも15塩基の鎖長を有するポリヌクレオチド、
- (8) (2) に記載の蛋白質またはペプチドに結合する化合物のスクリーニング方法であって、
 - (a) 該蛋白質またはペプチドに被検試料を接触させる工程、
 - (b) 該蛋白質またはペプチドと被検試料との結合を検出する工程、および
 - (c) 該蛋白質またはペプチドに結合する化合物を選択する工程、を含む方法、
- (9) (2) に記載の蛋白質またはペプチドとReg蛋白質との結合を阻害する化合物のスクリーニング方法であって、
 - (a) 被検試料存在下で(2) に記載の蛋白質またはペプチドとReg蛋白質とを接触させる工程、
 - (b) (2) に記載の蛋白質またはペプチドとReg蛋白質との結合を検出する工程、および
 - (c) 該結合を低下させる化合物を選択する工程、を含む方法、
- (10) (9) に記載の方法により単離されうる、(2) に記載の蛋白質またはペプチドとReg蛋白質との結合を阻害する化合物、
- (11) (2) に記載の蛋白質の活性化により生じるシグナル伝達を促進または阻害する化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) 被検試料の存在下で(2)に記載の蛋白質をその表面に発現する細胞にReg蛋白質を接触させる工程、

(b) Reg蛋白質による刺激に応答した該細胞の変化を検出する工程、および

(c) 被検試料非存在下において検出した場合(対照)比較して、該細胞の変化を増強または抑制する化合物を選択する工程、を含む方法、

(12) 該細胞の変化が、細胞増殖活性または細胞のDNA合成活性の変化である、

(11)に記載の方法、

(13)(11)または(12)に記載の方法により単離されうる、(2)に記載の蛋白質の活性化により生じるシグナル伝達を促進または阻害する化合物、

(14)(1)に記載のDNA、(2)に記載の蛋白質またはペプチド、(3)に記載のベクター、(6)に記載の抗体、(10)に記載の化合物、または(13)に記載の化合物を含む薬剤、

(15) Reg結合剤、Reg蛋白質に応答した細胞内シグナル伝達の調節剤、細胞増殖調節剤、DNA合成調節剤、およびアポトーシス調節剤からなる群より選択される、(14)に記載の薬剤、

(16) 糖尿病治療薬である、(14)または(15)に記載の薬剤、に関する。

本発明は、膵臓で発現しReg蛋白質に結合する新規な蛋白質(Reg結合蛋白質)に関する。本発明に含まれる、単離されたラット「Reg結合蛋白質」cDNAの塩基配列を配列番号：1および3に、これらのcDNAによりコードされる「Reg結合蛋白質」のアミノ酸配列をそれぞれ配列番号：2および4に示す。

本発明のラットReg結合蛋白質をコードするcDNAの1つは、364アミノ酸残基の蛋白質(配列番号：2)をコードするオープンリーディングフレームを含有する(配列番号：1)。このcDNAをプローブにしたスクリーニングにより、919アミノ酸残基の蛋白質(配列番号：4)をコードするオープンリーディングフレームを含有するラットReg結合蛋白質をコードするcDNA(配列番号：3)も単離することができた。本発明のラット「Reg結合蛋白質」は、細胞表面に発現し、Reg蛋白質

と結合する活性を有する。前述のように、Reg蛋白質は膵 β 細胞の再生時に特異的に発現する再生増殖因子であり、その蛋白質や遺伝子は糖尿病への治療の可能性が示されている。本発明のReg結合蛋白質は、このReg蛋白質の受容体として機能し、膵 β 細胞の増殖制御を含む細胞の生理機能の調節に関与していると考えられる。従って、本発明のReg結合蛋白質は糖尿病の病原のメカニズムを解明するための研究対象として、また膵 β 細胞の機能が関与する疾患（糖尿病など）に対する治療剤開発のためのツールとしての利用が考えられる。

最近、RegおよびReg関連遺伝子がいくつか単離され、これらは多重遺伝子群 Regファミリーを構成していることが明らかにされた（H. Okamoto, J. Mol. Med. 77, 74 (1999); H. Okamoto, J. Hepatobiliary Pancreat. Surg. 6, 254 (1999); M. Unno et al., J. Biol. Chem. 268, 15974 (1993); Y. Narushima et al., Gene 185, 159 (1997); M. Abe et al., Gene 246, 111 (2000)）。Regファミリーのメンバーはすべてエクソン6個およびイントロン5個からなる保存された遺伝子構成を示し、ファミリー内のアミノ酸配列の相同性は40～85%であり、3対の分子内S-S結合を形成する6個の保存されたシステイン残基を有する（H. Okamoto, J. Mol. Med. 77, 74 (1999); H. Okamoto, J. Hepatobiliary Pancreat. Surg. 6, 254 (1999); M. Unno et al., J. Biol. Chem. 268, 15974 (1993); Y. Narushima et al., Gene 185, 159 (1997); T. Itoh et al., FEBS Lett. 272, 85 (1990); M. Abe et al., Gene 246, 111 (2000)）。このファミリーのメンバーは、Reg蛋白質の一次構造に基づいてI型、II型およびIII型の3つのサブクラスに分けられる（H. Okamoto, J. Mol. Med. 77, 74 (1999); H. Okamoto, J. Hepatobiliary Pancreat. Surg. 6, 254 (1999); M. Unno et al., J. Biol. Chem. 268, 15974 (1993); Y. Narushima et al., Gene 185, 159 (1997); T. Watanabe et al., J. Biol. Chem. 265, 7432 (1990); M. Abe et al., Gene 246, 111 (2000)）。本実施例で用いたラットおよびヒトのReg蛋白質を含むI型Reg蛋白質は再生膵島で発現される（H. Okamoto, J. Mol. Med. 77, 74 (1999); K. Terazono, et al., J. Biol. Chem. 263, 2111 (1988); K.

Terazono, T. Watanabe, Y. Yonemura, in *Molecular biology of the islets of Langerhans*, H. Okamoto, Ed. (Cambridge University Press, Cambridge, 1990), pp. 301-313; K. Terazono et al., *Diabetologia* 33, 250 (1990); H. Okamoto, *J. Hepatobiliary Pancreat. Surg.* 6, 254 (1999)). 最近、病的条件下でのI型Regの発現が、ヒト大腸癌 (T. Watanabe et al., *J. Biol. Chem.* 265, 7432 (1990); M. E. Zenilman et al., *J. Gastrointest. Surg.* 1, 194 (1997); F. R. Bernard-Perrone et al., *J. Histochem. Cytochem.* 47, 863 (1999))、ラット胃粘膜 (H. Fukui et al., *Gastroenterology* 115, 1483 (1998))、およびエンテロクロマフィン様細胞 (M. Asahara et al., *Gastroenterology* 111, 45 (1996)) において報告されており、腸パネート細胞 (L. Christa et al., *Am. J. Physiol.* 271, G993 (1996))、肝細胞癌 (L. Christa et al., *Am. J. Physiol.* 271, G993 (1996))、膵腺房細胞 (L. Christa et al., *Am. J. Physiol.* 271, G993 (1996); E. M. Ortiz et al., *Gastroenterology* 114, 808 (1998))、およびシュワン細胞 (J. F. Livesey et al., *Nature* 390, 614 (1997)) の細胞増殖におけるIII型Reg蛋白質の関与も指摘されている。したがって、同定されたReg受容体は、Regファミリー遺伝子の産物に対する受容体として生理的条件下および病的条件下での種々の組織および細胞で機能しているものと考えられる。

以上の知見からもわかるように、本発明の蛋白質は、糖尿病に加え、消化管腫瘍 (Asahara, M. et al., *Gastroenterology* 111, 45-55 (1996); Fukui, H. et al., *Gastroenterology* 115, 1483-1493 (1998))、神経変性症 (Livesey, F.J. et al., *Nature* 390, 614-618 (1997))、膵炎 (Christa, L. et al., *Am. J. Physiol.* 271, G993-G1002 (1996); Ortiz, E. et al., *Gastroenterology* 114, 808-816 (1998)) などの治療や予防のための医薬品開発にも有用である。また、腫瘍などにおいてReg蛋白質-Reg結合蛋白質の異常 (例えば過剰刺激) が起こる場合には、可溶性のReg結合蛋白質の投与により過剰刺激を抑制し、腫瘍の増殖等を抑えることが可能であり、Reg結合蛋白質自体を治療に応用することも考えられる。

本発明においては、Reg蛋白質と結合する活性を有する限り、ラット「Reg結合蛋白質」と構造的に類似した蛋白質も含まれる。このような構造的に類似した蛋白質には、「Reg結合蛋白質」の変異体や他の生物由来の「Reg結合蛋白質」が含まれる。

このような蛋白質は、当業者であれば、例えば、公知の変異導入法を用いて調製することができる。当業者に公知の蛋白質中のアミノ酸を改変する方法としては、例えば、Kunkel法 (Kunkel, T.A. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 488)、Oligonucleotide-directed Dual Amber (ODA) 法 (Hashimoto-Gotoh, T. et al. (1995) Gene 152, 271-275)、PCR-制限酵素法 (Ito, W. et al. (1991) Gene 102, 67-70)、ODA-PCR法 (Hashimoto-Gotoh, T. et al. (1995) Gene 152, 271-275; Ito, W. et al. (1991) Gene 102, 67-70) などが挙げられる。蛋白質におけるアミノ酸の改変はその数に制限はないが、人為的に行うのであれば、通常、50アミノ酸以内、好ましくは10アミノ酸以内、さらに好ましくは5アミノ酸以内である。

また、蛋白質のアミノ酸の変異は天然においても生じうる。このようにReg蛋白質に結合する活性を有する限り、人為的なまたは自然界におけるアミノ酸の置換、欠失、付加、および/または挿入により天然型ラット「Reg結合蛋白質」に対してアミノ酸配列が異なる蛋白質も、本発明に含まれる。

置換されるアミノ酸は、置換前のアミノ酸と似た性質を有するアミノ酸であることが好ましいと考えられる。例えば、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Met、Phe、Trpは、共に非極性アミノ酸に分類されるため、互いに似た性質を有すると考えられる。また、非荷電性としては、Gly、Ser、Thr、Cys、Tyr、Asn、Glnが挙げられる。また、酸性アミノ酸としては、AspおよびGluが挙げられる。また、塩基性アミノ酸としては、Lys、Arg、Hisが挙げられる。

本発明において、ラット「Reg結合蛋白質」のアミノ酸が欠失した蛋白質には、細胞外領域のみを有する蛋白質が含まれる。また、ラット「Reg結合蛋白質」に対してアミノ酸が付加した蛋白質には、ラット「Reg結合蛋白質」と他のペプチドと

の融合蛋白質が含まれる。

また、Reg蛋白質に結合する活性を有する、ラット「Reg結合蛋白質」と構造的に類似した蛋白質の調製は、公知のハイブリダイゼーション技術（サムブルック他編集、モレキュラー・クローニング 第2版，コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー，1989年（Sambrook, J. et al.(1989) Molecular Cloning 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press)) やポリメラーゼ連鎖反応技術（サムブルック他編集、モレキュラー・クローニング 第2版，コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー，1989年（Sambrook, J. et al.(1989) Molecular Cloning 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press)； Innis, M.A. et al., PCR protocols, Academic Press (1990)) を利用して行うことができる。即ち、当業者にとってはラット「Reg結合蛋白質」cDNA配列（配列番号：1または3）若しくはその一部をプローブとして、また、ラット「Reg結合蛋白質」cDNAに特異的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドをプライマーとして、種々の他の生物からラット「Reg結合蛋白質」cDNAと相同性の高いDNAを単離し、さらに単離したDNAからラット「Reg結合蛋白質」と構造的に類似した蛋白質を得ることが常套手段となっている。

本発明においては、Reg蛋白質に結合する活性を有する限り、ラット「Reg結合蛋白質」cDNAとハイブリダイズするDNAがコードする蛋白質を包含する。このような蛋白質を単離する他の生物としては、例えば、ヒト、サル、マウス、ウサギ、ヤギ、ウシ、ブタ、イヌなどが挙げられるが、これらに制限されない。このような蛋白質をコードするDNAを単離するには、例えば、これら生物の脾ランゲルハンス島 β 細胞が材料として適していると考えられる。

ラット以外の生物に由来する「Reg結合蛋白質」をコードするDNAは、通常、ラット「Reg結合蛋白質」cDNAの塩基配列（配列番号：1または3）と高い相同性を有する。高い相同性とは、塩基配列レベルで少なくとも60%以上、好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上、最も好ましく

は 99%以上の配列の同一性を指す。配列の相同性は、FASTA（長い範囲で配列の類似性を保っているものを検索）、BLAST（局所的に高い類似性を有する配列を検索）、SSEARCH（Smith-Waterman algorithmを採用した検索）により決定することができる。これらは日本DNAデータベースなどの公知の遺伝子データベース、ホームページで使用する事が可能である。

ラット「Reg結合蛋白質」cDNAを利用してラット「Reg結合蛋白質」と機能的に同等な蛋白質をコードするcDNAを他の生物から単離するためのハイブリダイゼーションの条件としては、当業者であれば適宜選択することができる。一例を示せば、6×SSC / 5×FBP / 0.5% SDS / 0.2mg/ml 鮭（鯡）精子DNA / 10%ホルムアミド溶液で42℃（低ストリンジェントな条件）でハイブリダイゼーションを行うことができる。好ましくは、6×SSC / 5×FBP / 0.5% SDS / 0.2mg/ml 鮭（鯡）精子DNA / 30%ホルムアミド溶液で42℃（中間的なストリンジェントの条件）でハイブリダイゼーションを行う。さらに好ましくは、6×SSC / 5×FBP / 0.5% SDS / 0.2mg/ml 鮭（鯡）精子DNA / 50%ホルムアミド溶液で50℃（高ストリンジェントな条件）でハイブリダイゼーションを行う。但し、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーに影響する要素としては温度やホルムアミドの濃度、塩濃度など複数の要素が考えられ、当業者であればこれら要素を適宜選択することで同様のストリンジェンシーを実現することが可能である。

本発明の蛋白質は、天然の蛋白質の他、遺伝子組換え技術を利用した組換え蛋白質として調製することができる。天然の蛋白質は、例えば、「Reg結合蛋白質」が発現していると考えられる組織（例えば、腓ランゲルハンス島β細胞）の抽出液に対し、後述する「Reg結合蛋白質」に対する抗体を用いたアフィニティークロマトグラフィーを行う方法により調製することが可能である。一方、組換え蛋白質は、後述するように「Reg結合蛋白質」をコードするDNAで形質転換した細胞を培養し、この蛋白質を発現させ回収することにより調製することが可能である。

本発明は、本発明の蛋白質の部分ペプチドを包含する。本発明の蛋白質の部分

ペプチドとしては、例えば、本発明の蛋白質のうち、Reg蛋白質との結合部位に相当するペプチドが挙げられる。本発明の蛋白質の部分ペプチドは、生体投与することで、本発明の蛋白質のアゴニストやアンタゴニスト、Reg蛋白質の拮抗剤等としての利用が考えられる。これら部分ペプチドは、本発明の蛋白質を介したシグナル伝達の活性化剤や阻害剤として有用である。また、本発明の部分ペプチドとしては、例えば、本発明の蛋白質のN末端領域の部分ペプチドや、C末端領域の部分ペプチドが挙げられ、これらのペプチドは抗体の調製に利用することができる。本発明の蛋白質に特異的なアミノ酸配列を有する部分ポリペプチドは、少なくとも7アミノ酸、好ましくは少なくとも8アミノ酸、さらに好ましくは少なくとも9アミノ酸の鎖長を有する。本発明の部分ペプチドは、例えば、遺伝子工学的手法、公知のペプチド合成法、あるいは本発明の蛋白質を適当なペプチダーゼで切断することによって製造することがきでる。例えばReg蛋白質と結合する領域を含む部分ペプチドは、Reg蛋白質を結合させるために使用されうる。このような部分ペプチドは、Reg蛋白質結合剤として使用され得る。

また、本発明は、本発明の蛋白質をコードするDNAに関する。本発明の蛋白質をコードするDNAとしては、これら蛋白質をコードしうるものであれば特に制限はなく、cDNA、ゲノムDNA、および合成DNAが含まれる。また、本発明の蛋白質をコードしうる限り、遺伝暗号の縮重に基づく任意の塩基配列を有するDNAが含まれる。

本発明の蛋白質をコードするcDNAは、例えば、配列番号：1または3に記載のcDNAあるいはその断片、それらに相補的なRNA、または該cDNAの配列の一部を含む合成オリゴヌクレオチドを ^{32}P などで標識し、本発明の蛋白質が発現している組織（例えば脾臓など）由来のcDNAライブラリーにハイブリダイズさせることによりスクリーニングすることができる。あるいは、これらcDNAの塩基配列に対応するオリゴヌクレオチドを合成し、適当な組織（例えば脾臓など）由来のcDNAを鋳型にポリメラーゼ連鎖反応により増幅しクローニングすることもできる。ゲノムDNAは、例えば、配列番号：1または3に記載のcDNAあるいはその断片、それらに

相補的なRNA、または該cDNAの配列の一部を含む合成オリゴヌクレオチドを ^{32}P などで標識し、ゲノムDNAライブラリーにハイブリダイズさせることによりスクリーニングすることができる。あるいは、これらcDNAの塩基配列に対応するオリゴヌクレオチドを合成し、ゲノムDNAを鋳型にポリメラーゼ連鎖反応により増幅し、クローニングすることもできる。一方、合成DNAは、例えば、配列番号：1または3に記載のcDNAの部分配列を持つオリゴヌクレオチドを化学合成し、アニーリングさせて二本鎖にし、DNAリガーゼで結合させることにより調製することができる。

これらDNAは、組換え蛋白質の生産に有用である。即ち、本発明の蛋白質をコードするDNA（例えば、配列番号：1または3に記載のDNA）を適当な発現ベクターに挿入し、該ベクターを適当な細胞に導入して得た形質転換体を培養し、発現させた蛋白質を回収することにより本発明の蛋白質を組換え蛋白質として調製することが可能である。本発明の蛋白質は精製または粗精製蛋白質として、また、哺乳動物細胞で発現させ、膜に結合した形態として調製すること等が可能である。

具体的な宿主-ベクター系としては、例えば *E. coli*-pGEX系（アマシャムファルマシアバイオテック；GSTとの融合蛋白質として発現）、*E. coli*-pHB6系およびpVB6系（ロッシュダイアグノスティック；6個のヒスチジンとの融合蛋白質として発現）、*E. coli*-pMAL系（New England Biolabs；マルトース結合蛋白質との融合蛋白質として発現）、*E. coli*-pTYB系（New England Biolabs；Inteinとの融合蛋白質として発現、その後DTT存在下にInterin部分が切断され、目的蛋白質のみの精製が容易）、*Pichia*-pPIC系およびpGAP系（Invitrogen）、哺乳動物細胞（例えばCOS-7）-pCI-neo系（Promega）およびpHook系（Invitrogen）などが挙げられる。

宿主へのベクターの導入法は、*E. coli*へは公知のコンピテント細胞へのトランスフォーメーションまたは電気穿孔法、*Pichia*へは、例えば *Pichia Easy Comp Kit*（実施例1参照）により調製したコンピテント細胞へのトランスフォーメーション、または電気穿孔法、哺乳動物細胞へは電気穿孔法または公知のカチオニック

リピッドを用いたリポフェクション法等により行うことができる。

宿主細胞において発現させた組換え蛋白質は、公知の方法により精製することができる。また、本発明の蛋白質を、例えば、N末端にヒスチジン残基のタグ、またはグルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) などを結合した融合蛋白質の形で発現させた場合には、それぞれニッケルカラムまたはグルタチオンセファロースカラム等により精製することができる。

本発明の蛋白質をコードするDNAは、また、その変異に起因する疾患の遺伝子治療に応用することも可能である。例えば、ワクシニアウイルス、レトロウイルス等のウイルスベクターなどを用いた遺伝子治療が考え得る。治療の実際方法としては、例えば移植用の膵臓、または膵ランゲルハンス島に培養条件下でこれらの組換えウイルスを用いて「Reg結合蛋白質」を導入し、移植を行うことで膵β細胞の増殖により移植治療効果の向上と、移植用臓器の有効利用が図りうる。

本発明はまた、配列番号：1 または 3 に記載の塩基配列からなるDNAまたはその相補DNAとハイブリダイズし、少なくとも15塩基の鎖長を有するポリヌクレオチドに関する。該ポリヌクレオチドは、好ましくは配列番号：1 または 3 に記載の塩基配列からなるDNAと特異的にハイブリダイズし、少なくとも15塩基の鎖長を有するポリヌクレオチドである。「特異的にハイブリダイズする」とは、通常のハイブリダイゼーション条件下、好ましくは上記した中間的なストリンジェントなハイブリダイゼーションの条件下、より好ましくは上記した高ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で、他の蛋白質をコードするDNAとのクロスハイブリダイゼーションが有意に生じないことを意味する。ハイブリダイゼーションは、上記の条件で行えばよい。これらのポリヌクレオチドには、本発明の蛋白質をコードするDNA又は該DNAと相補的なDNAと特異的にハイブリダイズし得るプローブやプライマー、ヌクレオチド又はヌクレオチド誘導体（例えばアンチセンスオリゴヌクレオチドやリボザイム等）が含まれる。

本発明の蛋白質をコードするcDNAあるいはその配列の一部を含むオリゴヌクレ

オチドは、本発明の蛋白質をコードする遺伝子やcDNAのクローニング、あるいはPCRによる増幅に利用できる。また、本発明の蛋白質をコードするRNAの検出および定量に有用である。さらに、制限断片長多型 (RFLP)、1本鎖DNA高次構造多型 (SSCP) などの方法により、遺伝子あるいはcDNAの変異、多型、あるいは異常の検出(遺伝子診断など)に利用できる。

本発明の蛋白質は、膵臓の形成、再生、および/または維持、特に膵 β 細胞の量の調節に重要な機能を有することから、本発明のポリヌクレオチドを膵臓の検査、例えば膵 β 細胞の検査に利用することができる。また、本発明のポリヌクレオチドは糖尿病の検査に用いることもできる。例えば、被検者より膵臓組織サンプルを単離し、この組織における本発明の蛋白質の発現量の異常をノーザンハイブリダイゼーション、RT-PCR、またはDNAチップ (DNAマイクロアレイ) 等で検査することができる。また、本発明の蛋白質をコードするDNAまたはRNAの変異または多型の有無を、配列を決定したり、SSCPまたはRFLP等により検査することができる。ポリヌクレオチドを検査試薬として使用する場合は、適宜滅菌水や緩衝液、塩などと共に混合することができる。

また、本発明の蛋白質またはその部分ペプチド、該蛋白質またはペプチドをコードするDNA、および該DNAが挿入されたベクターは、後述の本発明の蛋白質とReg蛋白質との結合を阻害する化合物のスクリーニング、および本発明の蛋白質の活性化により生じるシグナル伝達(例えば細胞増殖活性または細胞のDNA合成活性など)を促進または阻害する化合物のスクリーニングのために使用され得る。これらのスクリーニングは、糖尿病等を含む膵 β 細胞の量または機能の異常に起因する疾患の治療薬または予防薬のアッセイにも適用することができる。糖尿病以外にも、消化管腫瘍、神経変性症、膵炎、腫瘍などの治療薬または予防薬のアッセイまたはスクリーニングのためにも使用され得る。

また、本発明は、本発明の蛋白質に結合する抗体に関する。本発明の抗体には、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体が含まれる。ポリクローナル抗体

は、例えば生体材料（例えば膵臓ランゲルハンス島）から調製した「Reg結合蛋白質」や、先に述べた宿主－ベクター系などで製造した組換え「Reg結合蛋白質」、または一般的なペプチド合成法により合成した部分ペプチドを抗原に公知の方法（Harlow, E. and Lane, D. Antibodies, Cold Spring Harbor Laboratory (1988) など）でウサギ、ヤギ、ヒツジなどを免疫してポリクローナル抗体を作製する。モノクローナル抗体は、生体材料（例えば膵臓ランゲルハンス島）から調製した「Reg結合蛋白質」や、先に述べた宿主－ベクター系などで作製した組換え「Reg結合蛋白質」、または一般的なペプチド合成法により合成した部分ペプチドを抗原に公知の方法（Harlow, E. and Lane, D. Antibodies, Cold Spring Harbor Laboratory (1988) など）で免疫したマウスやラットの脾細胞を用い、モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを得る。

ポリクローナル抗体では血清から、モノクローナル抗体ではハイブリドーマ培養上清またはハイブリドーマを接種した動物の腹水から硫酸分画、プロテインGセファロースカラム、抗原を固定したアフィニティーカラムなどの一般的な生化学的手法で抗体を精製する。

これにより調製された抗体は、本発明の蛋白質のアフィニティー精製のために用いられる他、例えば、本発明の蛋白質の発現異常や構造異常に起因する疾患の検査や診断、本発明の蛋白質の発現量の検出などに利用することが可能である。具体的には、例えば組織または細胞などから蛋白質を抽出し、ウェスタンブロッティング、免疫沈降、ELISA等の方法による本発明の蛋白質の検出を通して、発現や構造の異常の有無を検査・診断することができる。本発明の抗体は、膵臓の検査、例えば膵 β 細胞の検査に利用することもできる。また、本発明の抗体は糖尿病の検査に用いることもできる。例えば、被検者より膵臓組織サンプルを単離し、この組織における本発明の蛋白質の発現量または構造の異常をウェスタンブロット、免疫組織化学、ELISA、EIA等により検査することができる。抗体を検査試薬として使用する場合は、適宜滅菌水や緩衝液、塩、安定剤、保存剤などを組み

合わせることができる。また、本発明の抗体を抗体治療に用いることも考えられる。本発明の抗体を抗体治療に用いる場合、ヒト型抗体もしくはヒト抗体であることが好ましい。この場合は、ヒトリンパ球とHGPRT (hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase) 欠損マウスミエローマを融合しHAT培地にてヒトマウスヘテロハイブリドーマを選択する。このミエローマ細胞を、「Reg結合蛋白質」を抗原とした公知のRIA、ELISA法で選択し、「Reg結合蛋白質」に対するヒト型モノクローナル抗体を産生するクローンを得る。抗体の精製は上記の通り行うことができる。

また、本発明は、本発明の蛋白質に結合する化合物のスクリーニング方法に関する。このようなスクリーニングは、(a)本発明の蛋白質またはその部分ペプチドに被検試料を接触させる工程、(b)本発明の蛋白質またはその部分ペプチドと被検試料との結合を検出する工程、および(c)本発明の蛋白質またはその部分ペプチドに結合する化合物を選択する工程、を含む方法により実施することが可能である。

本発明の蛋白質は、スクリーニングの手法に依じて、精製蛋白質として、細胞表面に発現された形態として、細胞膜画分としてスクリーニングに用いることができる。

被検試料としては、これらに制限されないが、例えば、細胞抽出液、遺伝子ライブラリーの発現産物、合成低分子化合物、合成ペプチド、天然化合物などを用いることができる。被検試料は、必要に応じて適宜標識して用いられる。標識としては、例えば、放射標識、蛍光標識などが挙げられるが、これらに制限されない。

本発明の蛋白質と結合する蛋白質のスクリーニングは、例えば、本発明の蛋白質を固定したアフィニティーカラムに本発明の蛋白質と結合する蛋白質を発現していることが予想される細胞の培養上清もしくは細胞抽出物をのせ、カラムに特異的に結合する蛋白質を精製することにより、本発明の蛋白質に結合する蛋白質

のスクリーニングを実施することが可能である。

さらに、本発明の蛋白質と結合する蛋白質を発現していることが予想される組織若しくは細胞（例えば、膵 β 細胞など）よりファージベクターを用いたcDNAライブラリーを作製し、これをアガロース上で発現させフィルターに蛋白質を固定後、標識した本発明の蛋白質を反応させ、結合する蛋白質を発現しているブランクを検出する「ウエストウエスタンブロッティング法」や、GAL4 DNA結合領域およびGAL4転写活性化領域を、本発明の蛋白質および被検蛋白質との融合蛋白質として発現させ、GAL4 DNA結合蛋白質の結合配列を有するプロモーターの下流に連結させたレポーター遺伝子の発現を通して本発明の蛋白質と被検蛋白質との結合を検出する「twoハイブリッドシステム」等に従い実施することも可能である。

また、固定化した本発明の蛋白質に、合成化合物、天然物バンク、もしくはランダムファージペプチドディスプレイライブラリーを作用させ、結合する分子をスクリーニングする方法や、コンビナトリアルケミストリー技術によるハイスループットを用いたスクリーニングにより本発明の蛋白質に結合する化合物を単離する方法も当業者に周知の技術である。

また、BIACORE（Biacore社製）を利用したスクリーニングやマイクロフィジオメーター（モレキュラーデバイス社製）などを用いて本発明のReg結合蛋白質を強制発現させた培養細胞の酸分泌速度の変化をモニターする方法などが考えられる。

また、本発明は、本発明の蛋白質とReg蛋白質との結合を阻害する化合物のスクリーニング方法に関する。このようなスクリーニングは、(a) 被検試料存在下で本発明の蛋白質とReg蛋白質とを接触させる工程、(b) 本発明の蛋白質とReg蛋白質との結合を検出する工程、(c) 該結合を低下させる化合物を選択する工程、を含む方法により実施することが可能である。

本発明の蛋白質は、精製蛋白質として、細胞表面に発現された形態として、細胞膜画分としてスクリーニングに用いることができる。また、Reg蛋白質は、通常

、精製蛋白質としてスクリーニングに用いる。Reg蛋白質としては、例えば、ヒト REG I α やラットReg Iを用いることができる。これらの蛋白質は、組換え蛋白質として調製してもよい（実施例1参照）。Reg蛋白質は、必要に応じて $[^{125}\text{I}]$ 等の放射性同位元素等で標識しておいてもよい。

被検試料としては、これらに制限されないが、例えば、細胞抽出液、遺伝子ライブラリーの発現産物、合成低分子化合物、合成ペプチド、天然化合物などを用いることができる。

スクリーニングは、例えば、以下の如く行なうことができる。本発明の蛋白質を発現した細胞や、それから調製された膜画分に、被検試料の存在下で標識したリガンド（Reg蛋白質）を接触させ、本発明の蛋白質に結合する標識されたりガンドの量を測定する。被検試料が存在しない場合と比較して、このリガンドの量を低下させるような化合物を選択する。本発明の蛋白質とReg蛋白質との結合は、上記BIACOREやマイクロフィジオメーターを用いて測定することもできる。これにより単離される化合物は、本発明の蛋白質のアンタゴニストやアゴニストの候補となる。

また、本発明は、本発明の蛋白質の活性化により生じるシグナル伝達を促進または阻害する化合物をスクリーニングする方法に関する。このようなスクリーニングは、（a）被検試料の存在下で、本発明の蛋白質を表面に発現する細胞にReg蛋白質を接触させる工程、（b）Reg蛋白質刺激に応答した該細胞の変化を検出する工程、および（c）被検試料非存在下において検出した場合（対照）比較して、該細胞の変化を増強または抑制する化合物を選択する工程、を含む方法により実施することが可能である。

本発明の蛋白質をその表面に発現する細胞は、本発明の蛋白質をコードするDNAを適当な発現ベクターに挿入し、これにより構築したベクターを適当な宿主細胞に導入することにより調製することができる。宿主細胞としては、例えば、RINm5F細胞、CHO細胞、COS-7細胞などの細胞が挙げられる。ベクターとしては pCI-neo

(Promega)、pHook (Invitrogen) などが挙げられる。

被検試料としては、これらに制限されないが、例えば、細胞抽出液、遺伝子ライブラリーの発現産物、合成低分子化合物、合成ペプチド、天然化合物などを用いることができる。また、本発明の蛋白質との結合を指標とした上記のスクリーニングにより単離された化合物を被検試料として用いることも可能である。

Reg蛋白質は、通常、精製蛋白質としてスクリーニングに用いる。Reg蛋白質としては、例えば、ヒトREG I α やラットReg Iを用いることができる。これらの蛋白質は、組換え蛋白質として調製してもよい（実施例 1 参照）。

スクリーニングにおいては、被検試料存在下でのReg蛋白質刺激に応答した上記細胞の変化を検出する。Reg蛋白質刺激に応答した細胞の変化としては、例えば、細胞増殖活性の変化、細胞のDNA合成活性の変化、細胞のアポトーシスの程度の変化、本発明の蛋白質やそのシグナルを伝達する蛋白質のリン酸化、細胞内の特定の遺伝子の発現の変化などが挙げられるが、これらに制限されない。

細胞のDNA合成は、例えば実施例に示されるように 5'-プロモ-2'-デオキシウリジン (BrdU) の取り込みを測定することで検出することができる。また、³H-チミジンを細胞に添加し、細胞内に取り込まれた放射活性を測定することにより行ってもよい。³H-チミジンの細胞への取り込み試験は、DNA合成促進または抑制効果の測定に一般的に用いられている。この方法は比較的多量のサンプルを扱え、感度も高いなどの利点を有している。DNA合成を促進または抑制する化合物のスクリーニングにおいては、具体的には、例えば、細胞をマルチウェルプレート等に蒔き 1～2 日ほど培養後、被検試料を含む培地に交換し、24時間など一定時間インキュベートし、その後、例えば 1 μ Ci/ml の ³H-チミジンを添加する。インキュベート後、培地を除き細胞を洗浄してから 10% TCAを加え20分ほど氷上に置き、氷冷した 5% TCAで洗浄する。0.5N NaOHで細胞を溶解し、氷上に10分置いてから 1/2容の 1N HClを加え穏やかに混合し、さらに40% TCAを終濃度10%になるように加えて穏やかに混合する。20分氷上に静置した後、Whatman GF/C フィルタ

一などで濾過して不溶物を回収する。100%エタノールで3回洗浄し乾燥させた後、液体シンチレーションカウンターで放射活性を計測する。

また、細胞の増殖は、細胞数の計測やコロニー数の計測、または細胞にMTTもしくはAlamar Blueなどの色素を加え、細胞数に依存した発色を測定することにより行うことができる。MTT法はMTT (3-(4,5-ジメチルチアゾル-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウム ブロマイド)による発色によって細胞増殖活性を測定するもので、生細胞のミトコンドリアの呼吸鎖に作用しMTTホルマザンを生成する。この生成量は細胞数を反映する。具体的には、例えば、96ウェルプレートで細胞を培養し、被検試料を作用させたのち、5 mg/ml MTT溶液を10 μ l加え、4時間インキュベートする。0.04N HCl/イソプロパノールを100 μ l加え、よく混合し、数分放置する。マイクロプレートリーダーを用いて、レファレンス波長 630nm、テスト波長570nmで測定する。また、実施例 1 1のようにテトラゾリウム塩4[-3-(4-ヨードフェニル)-2-(4-ニトロフェニル)-2H-5-テトラゾリオ]-1,3-ベンゼンジスルホネート (WST-1) を用いて測定することもできる。

細胞のアポトーシスは、例えば核の形態変化 (核の凝縮、分断)、染色体の断片化 (ダラー形成) などを指標として測定することができる。具体的には、例えばTUNEL法 [Y. Gavrieli et al., J. Cell Biol. 119, 493 (1992)] 等によりアポトーシスを検出することができる (実施例 1 1 参照)。

蛋白質のリン酸化は、セリン、スレオニン、またはチロシン残基等に起こると考えられる。これらリン酸化の変化は、抗リン酸化セリン、スレオニン、またはチロシン抗体によるウェスタン法や免疫沈降法により、細胞内蛋白質のリン酸化状態を測定することで検出が可能である。リン酸化される蛋白質としては、細胞増殖に関与するMAPキナーゼ系やSTAT系、あるいはFos-Jun系蛋白質などが予想されるが、これら例示した蛋白質に限らない。

上記蛋白質リン酸化などにより、種々の遺伝子の転写が誘導されたり抑制されたりすることが知られている。本発明の蛋白質とそのリガンドとの結合に依存し

た特定の遺伝子の発現の変化は、レポーター遺伝子を利用して検出することができる。即ち、該遺伝子のプロモーターの下流にレポーター遺伝子を連結し、レポーター遺伝子の発現を検出することで測定できる。また、特定の遺伝子の発現の変化は、ノーザンブロッティング法やRT-PCR法などのmRNAを検出する方法、遺伝子の翻訳産物である蛋白質を抗体などを用いて検出する方法、遺伝子の翻訳産物である蛋白質の活性を検出する方法により測定することもできる。

これらのスクリーニングにより単離される化合物としては、例えば、①本発明の蛋白質に結合し、その活性を促進または阻害する化合物、②本発明の蛋白質またはReg蛋白質等の本発明の蛋白質のリガンドに結合し、本発明の蛋白質とリガンドとの結合を促進または阻害する化合物、③本発明の蛋白質のリガンドに結合し、その活性化を促進または阻害する化合物、④本発明の蛋白質から細胞の変化を発現するに至るシグナル伝達を促進または阻害する化合物が含まれる。

これら化合物は、本発明の蛋白質を介したシグナル伝達系の異常などに起因する疾患（例えば、膵β細胞の機能の異常に起因する疾患）の予防薬や治療薬への応用が考えられる。例えば、糖尿病の治療薬への応用が考えらる。

本発明のDNA、本発明の蛋白質またはその部分ペプチド、本発明のDNAを含むベクター、本発明の蛋白質またはその部分ペプチドに対する抗体、および上記スクリーニングにより単離し得る化合物は、単独で、または他の化合物と組み合わせて薬剤として用いることができる。本発明の薬剤には、試薬および医薬が含まれる。

例えば、本発明の蛋白質はReg蛋白質と結合する活性を有することから、本発明の蛋白質およびその部分ペプチドを、Reg蛋白質と結合させるために使用することができる。このような蛋白質またはペプチドは、Reg蛋白質の検出やアフィニティ精製などに利用し得る。本発明の蛋白質またはその部分ペプチドをReg蛋白質と接触させることにより、本発明の蛋白質またはその部分ペプチドをReg蛋白質と結合させることができる。本発明の蛋白質またはその部分ペプチドは精製されてい

てもよいし、細胞膜表面に発現していてもよい。また、担体に結合していてもよい。結合させるReg蛋白質の由来に制限はなく、マウス、ラット、ヒトなどのReg蛋白質を結合させることができる。また、本発明の蛋白質またはその部分ペプチドをコードするDNAおよび該DNAが挿入されたベクターも、本発明の蛋白質またはその部分ペプチドを細胞で発現させることにより、同様の目的で使用するすることができる。このように本発明の蛋白質およびその部分ペプチド、これらをコードするDNA、あるいは該DNAが挿入されたベクターを含む薬剤は、Reg蛋白質結合剤とすることができる。

また本発明の蛋白質は、Reg蛋白質の受容体として機能する。従って、本発明の蛋白質は、Reg蛋白質に応答した細胞内シグナル伝達を調節（促進または抑制）するために使用することができる。本発明の蛋白質を活性化することによりシグナル伝達が促進され、逆に本発明の蛋白質の活性化を阻害することによりシグナル伝達は遮断される。例えば、本発明の蛋白質（例えば配列番号：4）を発現する細胞にReg蛋白質などの本発明の蛋白質のリガンドまたはアゴニストを接触させることにより本発明の蛋白質を活性化させ、細胞内にシグナルを伝達させることができる。細胞は、好ましくは膵 β 細胞系の細胞または上皮細胞などである。また、Reg蛋白質と結合するが、細胞内にシグナルを伝達しない蛋白質は、Reg蛋白質のシグナル伝達を遮断するために使用することができる。このような蛋白質としては、Reg蛋白質との結合領域を保持するが、下流へのシグナル伝達部位を持たない蛋白質などが挙げられる。このような蛋白質を細胞で発現させることにより、または細胞外に添加することにより、Reg蛋白質によるシグナル伝達を遮断することができる。本発明の蛋白質またはその部分ペプチドをコードするDNAおよび該DNAが挿入されたベクターも、本発明の蛋白質またはその部分ペプチドを細胞で発現させることにより、同様の目的で使用するすることができる。また、本発明の蛋白質またはその部分ペプチドに結合する抗体、本発明のスクリーニングにより単離し得る化合物も、同様の目的で使用し得る。このように本発明の蛋白質またはそ

の部分ペプチド、該蛋白質またはペプチドをコードするDNA、該DNAが挿入されたベクター、本発明の抗体、および本発明のスクリーニングにより単離し得る化合物は、Reg蛋白質に応答した細胞内シグナル伝達の調節剤（促進剤または抑制剤など）とすることができる。

また、Reg蛋白質に応答した細胞内シグナル伝達としては、細胞のDNA合成の促進、および細胞の増殖の調節（促進または抑制）が挙げられる。すなわち、本発明の蛋白質は、細胞のDNA合成を促進するために、また、細胞増殖を促進または抑制するために使用することができることを示している。対象となる細胞は、好ましくは膵 β 細胞系の細胞または上皮細胞などである。本発明の蛋白質を発現する細胞に、本発明の蛋白質のリガンド（例えばReg蛋白質）またはアゴニストを接触させることにより、DNA合成を促進し、細胞増殖（または分裂）を促進することができる。本発明の蛋白質を外来的に細胞に発現させる場合は、本発明の蛋白質（例えば配列番号：4）を発現するベクターを細胞に導入する。また、Reg蛋白質と結合するが、細胞内にシグナルを伝達しない蛋白質は、DNA合成を抑制、または細胞増殖を抑制するために使用することができる。このような蛋白質としては、Reg蛋白質との結合領域を保持するが、下流へのシグナル伝達部位を持たない蛋白質が挙げられる。このような蛋白質を細胞で発現させることにより、または細胞外に添加することによりDNA合成を抑制または細胞増殖を抑制することができる。本発明の蛋白質またはその部分ペプチドをコードするDNAおよび該DNAが挿入されたベクターも、本発明の蛋白質またはその部分ペプチドを細胞で発現させることにより、上記と同様の目的で使用し得る。また、本発明の蛋白質またはその部分ペプチドに結合する抗体、本発明のスクリーニングにより単離し得る化合物も、DNA合成または細胞増殖を調節するために使用することができる。例えば、本発明の蛋白質のリガンドまたはアゴニストとして作用する抗体や化合物は、これを生体に投与することにより細胞（膵 β 細胞など）の増殖を促進することが可能である。投与は *in vitro* および *in vivo* で行い得る。このように本発明の蛋白質また

はその部分ペプチド、該蛋白質またはペプチドをコードするDNA、該DNAが挿入されたベクター、本発明の抗体、および本発明のスクリーニングにより単離し得る化合物は、細胞のDNA合成または細胞増殖の調節剤（促進剤または抑制剤など）とすることができる。

また、本発明の蛋白質の活性化により生じるシグナル伝達としては、細胞のアポトーシスの誘導が挙げられる。すなわち、本発明の蛋白質は、細胞のアポトーシスを調節（アポトーシスの誘導または誘導の抑制）するために使用することができる。本発明の蛋白質またはその部分ペプチドをコードするDNAおよび該DNAが挿入されたベクターも、本発明の蛋白質またはその部分ペプチドを細胞で発現させることにより、同様の目的で使用する事ができる。また、本発明の蛋白質またはその部分ペプチドに結合する抗体、本発明のスクリーニングにより単離し得る化合物も、アポトーシスを調節するために使用することができる。対象となる細胞は、好ましくは膵 β 細胞系の細胞または上皮細胞などである。本発明の蛋白質を発現する細胞に、本発明の蛋白質のリガンド（例えばReg蛋白質）を高濃度で接触させることにより、アポトーシスを誘導することができる。Reg蛋白質は、例えば100nMより高い濃度、好ましくは500nM以上の濃度、より好ましくは1000nM以上の濃度で細胞に接触させる。本発明の蛋白質を外来的に細胞に発現させる場合は、本発明の蛋白質（例えば配列番号：4）を発現するベクターを細胞に導入する。また、Reg蛋白質と結合するが、細胞内にシグナルを伝達しない蛋白質は、Reg蛋白質によるアポトーシスの誘導を抑制するために使用することができる。このような蛋白質を細胞で発現させることにより、または細胞外に添加することによりアポトーシスを抑制することができる。このように本発明の蛋白質またはその部分ペプチド、該蛋白質またはペプチドをコードするDNA、該DNAが挿入されたベクター、本発明の抗体、および本発明のスクリーニングにより単離し得る化合物は、細胞のアポトーシスの調節剤（誘導剤または抑制剤など）とすることができる。

本発明の蛋白質またはその部分ペプチド、該蛋白質またはペプチドをコードするDNA、該DNAが挿入されたベクター、本発明の抗体、および本発明のスクリーニングにより単離し得る化合物は、公知の薬学的手法に従い、蒸留水、緩衝液、塩、BSA、グリセロール、安定剤、保存剤、界面活性剤などを組み合わせて組成物とすることができる。また、本発明の薬剤は、上述のように脾臓の検査のための試薬として用いることもできる。また、糖尿病、消化管腫瘍、神経変性症、脾炎、腫瘍などの治療または予防のための医薬組成物としても有用である。

本発明の薬剤を医薬として用いる場合には、本発明の蛋白質またはその部分ペプチド、該蛋白質またはペプチドをコードするDNA、該DNAが挿入されたベクター、本発明の抗体、および本発明のスクリーニングにより単離し得る化合物自体を直接患者に投与する以外に、公知の製剤学的方法により製剤化して投与を行うことが可能である。例えば、薬理学上許容される担体もしくは媒体、具体的には、滅菌水や生理食塩水、デキストロース、グリセロール、エタノール、植物油、乳化剤、懸濁剤、界面活性剤、安定剤などと適宜組み合わせて製剤化して投与することが考えられる。本発明の医薬組成物は、水溶液、錠剤、カプセル、トローチ、バッカル錠、エリキシル、懸濁液、シロップなどの形態であり得る。活性化合物の含有率は適宜決定すればよい。患者への投与は、例えば、動脈内注射、静脈内注射、皮下注射などのほか、鼻腔内的、経気管支的、筋内的、または経口的に当業者に公知の方法により行いうる。投与は、全身投与または局所投与で行い得る。投与量は、患者の体重や年齢、投与方法、症状などにより変動するが、当業者であれば適当な投与量を適宜選択することが可能である。投与は1回から数回に分けて行うことができる。また、該化合物がDNAによりコードされうるものであれば、該DNAを遺伝子治療用ベクターに組み込み、遺伝子治療を行うことも考えられる。投与はエキスピボまたはインピボで行い得る。投与量、投与方法は、患者の体重や年齢、症状などにより変動するが、当業者であれば適宜選択することが可能である。

図面の簡単な説明

図1は、ラットインスリノーマ由来細胞株RINm5F細胞にヒトREG蛋白質 (REG I α) を添加したときのBrdUの取り込みを測定した結果を示す図である (実施例3)。

図2は、RINm5F細胞に [125 I] 標識したラットReg蛋白質 (Reg I) を添加したときの細胞への結合を測定した結果を示す図である (実施例4)。「Hot」は標識したラットReg蛋白質のみ、「Hot + 100×Cold」は、標識したラットReg蛋白質と100倍量の非標識ラットReg蛋白質を共に添加したときの結果を示す。

図3は、単離されたReg結合蛋白質をCOS-7細胞で発現させ、 [125 I] 標識したラットReg蛋白質 (Reg I) を添加したときの細胞への結合を測定した結果を示す図である (実施例6)。「pCI-neo」は空ベクター、「pCI-167.1」はReg結合蛋白質発現ベクターを導入した細胞の結果を表す。また、(-)は標識したラットReg蛋白質のみ、(+)は標識したラットReg蛋白質と100倍量の非標識ラットReg蛋白質を共に添加したときの結果を表す。

図4は、ラットReg結合蛋白質 (Reg受容体) (rEXTL3) (配列番号：4)、ヒトEXTL3/EXTR1 (hEXTL3) (GenBankアクセッション番号 AF001690およびAB007042) (配列番号：5)、ヒトEXT2 (hEXT2) (GenBankアクセッション番号 U64511) (配列番号：6)、ヒトEXT1 (hEXT1) (GenBankアクセッション番号 S79639) (配列番号：7)、ヒトEXTL1 (hEXTL1) (GenBankアクセッション番号 U67191) (配列番号：8)、およびヒトEXTL2 (hEXTL2) (GenBankアクセッション番号 AF000416) (配列番号：9) の予想される蛋白質アミノ酸配列を整列化した図である (実施例7)。膜貫通ドメインには下線を施した。右欄の数字はアミノ酸残基に対応する。ラットReg結合蛋白質 (rEXTL3) と同一の残基はドットで示した。ハイフンはラットReg結合蛋白質 (rEXTL3) に対応する残基がないことを示す。

図5は、Reg結合蛋白質の細胞分布を示す図である。レーン1, コントロールペ

クターを導入したCOS-7細胞のホモジネート；レーン2～6，Reg結合蛋白質発現ベクターを導入したCOS-7細胞のホモジネート、膜画分、ミトコンドリア画分、ミクロソーム画分、およびサイトゾル画分（実施例8）。各レーンで蛋白質10 μ gを電気泳動し、Reg結合蛋白質に付加したHAタグに対する抗体でウェスタンブロットを行った。Reg蛋白質は細胞表面に発現することが分かる。

図6は、ヒトEXTL3/EXTR1のラット相同体は細胞表面型Reg結合蛋白質であることを示す図である（実施例9）。非標識ラットReg蛋白質の存在下（+、100倍過剰量）または非存在下（-）における [125 I] Reg蛋白質のReg結合蛋白質発現細胞との結合を示す。「pCIneo」は空ベクターを導入した対照、「pCI-rEXTL3」はラットReg結合蛋白質発現ベクターを導入した細胞の結果を示す。4回の別々の実験の平均土標準誤差（s.e.m.）として示した。

図7は、Reg受容体の機能解析を示す図である。（A）Reg受容体を安定に発現するCHO細胞へのラットReg蛋白質によるBrdU取り込みを示す図である（実施例10）。Reg受容体を発現する2つの独立した細胞系（RegR-#3およびRegR-#22）を検討した。結果は8回の別々の実験の平均土標準誤差として示した。（B）ラットReg（丸）およびヒトREG（四角）とラットReg受容体との競合結合曲線を示す図である。結果は4回の別々の実験の平均土標準誤差として示した。

図8は、Reg受容体を発現する β 細胞の増殖およびアポトーシスを示す図である（実施例11）。Reg受容体を発現する3つの独立した細胞系（#1、#6および#24）を検討した。RINはRINm5Fコントロールを表わす。結果は4～8回の別々の実験の平均土標準誤差として示した。（A）Reg受容体を安定に発現するRINm5F細胞へのラットReg蛋白質によるBrdUの取り込み。（B）生細胞によるWST-1の切断のReg蛋白質による増加。（C）Reg蛋白質によって誘導されるRINm5F細胞のアポトーシスをTUNEL法によって定量的に評価した結果。

図9は、Reg受容体mRNAの発現を示す図である（実施例12）。RNaseプロテクションアッセイによりReg受容体mRNAの発現を調べた。309塩基のバンドは、ラット

Reg受容体mRNAによるプロテクションサイズに対応する。(A) β 細胞におけるReg受容体mRNAの発現を示す。ニコチンアミド0.5mg/kg/日の腹腔内投与を1~3箇月間行った90%膵切除ラットから再生ラ島を単離した(K. Terazono, et al., J. Biol. Chem. 263, 2111 (1988); K. Terazono, T. Watanabe, Y. Yonemura, in Molecular biology of the islets of Langerhans, H. Okamoto, Ed. (Cambridge University Press, Cambridge, 1990), pp. 301-313; K. Terazono et al., Diabetologia 33, 250 (1990); Y. Yonemura et al., Diabetes 33, 401 (1984))。レーン1、正常膵島；レーン2、膵部分切除から1箇月後の再生ラ島；レーン3、膵部分切除から2箇月後の再生ラ島；レーン4、膵部分切除から3箇月後の再生ラ島；レーン5、RINm5F細胞；レーン6、ARIP細胞。レーンPにはプローブのみを泳動した。(B) ラット組織におけるReg受容体mRNAの発現。レーン1、正常膵島；レーン2、膵全体；レーン3、肝臓；レーン4、腎臓；レーン5、心臓；レーン6、脾臓；レーン7、胸腺；レーン8、精巣；レーン9、副腎；レーン10、胃；レーン11、空腸；レーン12、回腸；レーン13、結腸；レーン14、下垂体；レーン15、脳。

図10は、Reg受容体を安定に発現するCHO細胞における生細胞によるWST-1の分解はReg蛋白質によって増加することを示す図である(実施例12)。図7(A)と同様に2つの独立した細胞系を用いた。結果は8回の別々の実験の平均±標準誤差として示した。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

〔実施例1〕 ヒトREG蛋白質(Reg I α)およびラットReg蛋白質(Reg I)発現ベクターの構築

ヒトREG I α cDNA (Terazono, K. et al., J. Biol. Chem. 263, 2111-2114 (1998))の蛋白質コード領域の全長をPichia発現用ベクターpPIC3.5 (Invitrogen社製)

の酵母アルコールオキシダーゼプロモーターの下流のSnaBI/AvrIIサイトにリンカーを用いて挿入し、発現ベクターを構築した。ラットReg I cDNA (Terazono, K. et al., 上記) の蛋白質コード領域の全長も同様に、pPIC3.5のSnaBI/NotIサイトにリンカーを用いて挿入した。これら2種類の発現ベクターDNAをCsCl法で精製し、Pichia Easy Comp Kit (Invitrogen社製) を用いて調製したコンピテント細胞 (Pichia GS115株) に導入した。発現ベクター導入細胞は、ヒスチジンを含まない培地で増殖できるようになることで選択した。発現ベクター導入細胞の中から、メタノール添加により培地中に産生・分泌されるヒトREG蛋白質・ラットReg蛋白質が最大となるクローンを選択した。

【実施例2】 ヒトREG蛋白質 (REG I α) およびラットReg蛋白質 (Reg I) の調製

上記ヒトREG蛋白質またはラットReg蛋白質を産生するPichia (Pichia pastoris) をBMGY培地 (1% 酵母エキストラクト、2% ポリペプトン、100mM リン酸カリウム緩衝液 (pH6.0)、1.34% Yeast Nitroge Base、0.00004% ビオチン、1% グリセロール) で 28~30℃で 16~18時間前培養後、BMGY培地でOD₆₀₀が 2~5 にまるまで大量培養を行った。酵母を遠心分離で回収し、OD₆₀₀が 1 になるようにBMMY培地 (1% 酵母エキストラクト、2% ポリペプトン、100mM リン酸カリウム緩衝液 (pH6.0)、1.34% Yeast Nitroge Base、0.00004% ビオチン、0.5% メタノール) に再懸濁し、28~30℃で 3~4日培養した。この間24時間おきに終濃度0.5%になるようにメタノールを加えた。遠心分離で培養液を回収し、酢酸を加え pHを 3.5 に調整した。pH調整済みの培養液を 50mM 酢酸ナトリウム (pH 3.5) で平衡化したSTREAMLINE SP (Pharmacia) にアブライし、50mM 酢酸ナトリウム (pH 3.5) で洗浄後、50mM 酢酸ナトリウム (pH 3.5) / 0.5M NaClで溶出した。産生された蛋白質がそれぞれヒトREG蛋白質またはラットReg蛋白質であることは、マスマススペクトロメトリーで確認した。

【実施例3】 ラットインスリノーマ由来培養細胞RINm5F細胞に対するREG蛋白質

の添加効果

ラットインスリノーマ由来の培養細胞RINm5F細胞 (Zenilman, M.E. et al., Gastroenterology 110, 1208-1214 (1996)) にREG蛋白質を添加し、5'-ブromo-2'-デオキシウリジン (BrdU) の取り込み (細胞増殖活性) を測定した。まず 5×10^5 細胞/mlのRINm5F細胞 100 μ lを96穴プレートに蒔き、37°Cで2日間培養した。その後、培養液を下記に示す培養液100 μ lに置換した。ヒトREG I α は実施例2で調製したものをを用いた。

培地+1% FCS

培地+1% FCS+ヒトREG I α (1 nM; 0.016 μ g/ml)

培地+1% FCS+ヒトREG I α (10 nM; 0.16 μ g/ml)

培地+1% FCS+ヒトREG I α (100 nM; 1.6 μ g/ml)

培地+1% FCS+ヒトREG I α (1000 nM; 16 μ g/ml)

37°Cで24時間インキュベートし、BrdUラベリング溶液 (10mMのBrdU原液を培地で100 μ Mになるように希釈したもの) を10 μ l/ウェル加えた (終濃度10 μ M BrdU)。37°Cで12時間インキュベートしたのち培地を除き、FixDenat (ロッシュダイアグノスティック社製) を200 μ l/ウェル加えた。室温で15分間インキュベートしてからFixDenat溶液を除き、抗BrdU-POD抗体 (ストック溶液 (ロッシュダイアグノスティック社製) を1/100希釈したもの) を100 μ l/ウェル加えた。室温で60分間インキュベートし、抗BrdU-POD抗体溶液を除いた後、洗浄液 (10 \times 洗浄液 (ロッシュダイアグノスティック社製) を1/10希釈したもの) 200 μ l/ウェルで3回リンスした。基質溶液 (ロッシュダイアグノスティック社製) を100 μ l/ウェル加え、十分な発色を得られるまで室温でインキュベートした。各試料はELISAリーダーを用いて370nmの吸光度を測定した (レファレンス波長: 約492nm)。

その結果、REG蛋白質の濃度依存的な細胞増殖が見られた (図1)。

[実施例4] RINm5F細胞に対するReg蛋白質の結合活性の測定

まず、以下のようにして、[¹²⁵I]RegI希釈液を調製した。 [¹²⁵I]ラットRegI原液

(50ng/ μ l \sim 3.33 μ M, 8.6×10^5 cpm/ μ l) をDMEMで、それぞれ 1nM、333pM、100pM、33pM、および10pMとなるように希釈した。また、非標識のRegI原液 (460ng/ μ l=30.6 μ M) を、 $[^{125}\text{I}]$ RegIの100倍濃度で含むように加えた希釈液を同様に調製した。 4×10^5 細胞/mlのRINm5F細胞 3mlを6穴プレートに蒔き、37°Cで2日間培養した。冷DMEMで洗浄後、上記 $[^{125}\text{I}]$ ラットRegIを含むDMEM 3mlを加えた(終濃度 10pM, 33pM, 100pM, 333pM, 1nM)。競合阻害実験においては、100倍の非標識 RegIを共存させたDMEMを用いた。氷上で2時間静置し、DMEMで3回洗浄した後、0.5 \sim 1 ml/ウェルの [100mM Tris-HCl (pH7.6), 1mM EDTA, 1% Triton X-100] を加えてリシスさせ、 γ -カウンタで $[^{125}\text{I}]$ をカウントした。

その結果、大過剰の非標識Reg蛋白質により結合が阻害されており、特異的な結合に必須の分子がRINm5F細胞膜上に存在することが示された (図2)。

[実施例5] Reg結合蛋白質の同定と単離

ラット腭ランゲルハンス島Poly(A)⁺ RNAを鋳型に入ZAP IIベクターによる腭ランゲルハンス島発現型cDNAライブラリーを作製した。実施例2で調製したラットReg蛋白質をBolton-Hunter試薬を用いて ^{125}I 標識し、発現型cDNAライブラリーからWest-Western法でReg蛋白質と結合するファージクローンを選択・単離した。

陽性ファージクローンからヘルパーファージを用いた in vivo 切り出し法でcDNAをプラスミドベクター (pBluescript SK(-), Stratagene社製) に組み換えた。ジデオキシ法でcDNAの塩基配列を決定した。その塩基配列を配列番号: 1に、予想されるアミノ酸配列を配列番号: 2に示す。塩基配列から推定される蛋白質は1個の疎水性アミノ酸クラスターの膜貫通領域を有する細胞膜蛋白質と考えられた。

[実施例6] Reg結合蛋白質のCOS-7細胞での発現

実施例5で単離したcDNAをサイトメガロウイルスプロモーターを持つ哺乳動物用発現ベクター (pCI-neo) (Promega) に組み込み、Reg結合蛋白質発現ベクター (pCI-167.1) を構築した。このベクターをCOS-7細胞へエレクトロポレーション

法で導入して一過性に発現させた。ベクター導入 48時間後に、実施例 4 と同様のプロトコールでReg結合活性を検討した。

具体的には、まず $[^{125}\text{I}]$ ラットRegI原液 ($50\text{ng}/\mu\text{l} \sim 3.33\mu\text{M}$, $2.7 \times 10^5 \text{ cpm}/\mu\text{l}$) をDMEMで 10nM となるように希釈した。また、非標識のRegI原液 ($2250\text{ng}/\mu\text{l} = 150\mu\text{M}$) を、 $[^{125}\text{I}]$ RegIの100倍濃度 ($1\mu\text{M}$) 含むようにこの液に加えた希釈液を別に調製した。

2.5×10^5 細胞/mlのトランスフェクトしたCOS細胞 3mlを6穴プレートに蒔き、 37°C で2日間培養した。冷DMEMで洗浄後、 $[^{125}\text{I}]$ ラットRegIを含むDMEM 3ml を加えた(終濃度 10nM)。競合阻害実験においては、100倍の非標識 RegIを共存させた。氷上で2時間静置し、DMEMで3回洗浄した後、1 ml/ウェルの $[100\text{mM Tris-HCl (pH7.6), 1\text{mM EDTA, 1\% Triton X-100}]$ を加えてリシスさせ、 γ -カウンタで $[^{125}\text{I}]$ をカウントした。

その結果、このcDNAを導入した細胞では、ベクターのみを導入した細胞に比較して ^{125}I 標識Reg蛋白質との結合が著明に増大していた。また、この結合は過剰量の非標識Reg蛋白質の添加により消失した(図3)。このことから、単離されたcDNAがコードする蛋白質は哺乳動物細胞膜上でReg蛋白質と結合する分子であると考えられ、Reg蛋白質の β 細胞再生増殖活性を担う受容体分子である可能性が考えられた。

[実施例 7] ラット膵島cDNAライブラリーのスクリーニング

Reg結合蛋白質をコードするcDNAをさらに単離するため、実施例 5 で得られたcDNAをプローブとして用い、プラークハイブリダイゼーションにより、ラット膵島cDNAライブラリー (5×10^6 クローン) をスクリーニングした結果、陽性クローン8個を得た。この8個のクローンは互いに大部分が重複しており、重複領域のヌクレオチドは完全に一致していた。得られたラットReg結合蛋白質をコードするcDNAの配列を配列番号: 3 に、このcDNAによりコードされるReg結合蛋白質のアミノ酸配列を配列番号: 4 に示す。

図4に示す通り、このcDNAは919アミノ酸からなる蛋白質をコードする2,760bpのオープンリーディングフレームを有しており、cDNAから推定されるアミノ酸配列から、この蛋白質は長い細胞外ドメイン（868アミノ酸残基）、膜貫通ドメイン（残基29～51）およびN末端に短い細胞内領域を有するII型膜貫通蛋白質であることが予想された。

〔実施例8〕 ラットReg結合蛋白質の発現

実施例7で単離されたラットReg結合蛋白質cDNAの発現ベクターを作製し、COS-7細胞内で一過的に発現させた。N末端にヘマグルチニン（HA）ノナペプチドタグ（YPYDVPDYA）を付加するようにこのタグをコードするオリゴヌクレオチドを連結したラットReg結合蛋白質cDNAをpCI-neo哺乳動物発現ベクター（Promega）に挿入し、このベクターを電気穿孔法によってCOS-7細胞に導入して発現させた。48時間インキュベートした後に細胞を回収し、以前の記載〔S. Takasawa et al., J. Biol. Chem. 268, 26052 (1983) ; H. Okamoto et al., Meth. Enzymol. 280, 306 (1997)〕の通りにホモジェナイズおよび分画を行った。蛋白質試料を12.5% (w/v) SDSポリアクリルアミドゲル上での電気泳動にかけ、immobilon-P（Millipore）にトランスファーした。HAに対するモノクローナル抗体を用いて、以前の記載の通りにウエスタンブロット解析を行った〔S. Takasawa et al., J. Biol. Chem 270, 30257 (1995) ; H. Okamoto et al., Meth. Enzymol. 280, 306 (1997)〕。HAに対するモノクローナル抗体は抗HA 3F10（Boeringer）を用いた。

イムノブロット解析の結果、このcDNAによってコードされる蛋白質は主として細胞膜画分に発現され、見かけの分子量は105kDであり（図5A）、予想されるアミノ酸配列から算出された分子量（104,682）とよく一致することが明らかになった。

〔実施例9〕 ラットReg結合蛋白質のReg蛋白質への結合

実施例8で作製したラットReg結合蛋白質（ラットEXTL3/EXTR1とも称す）発現ベクターまたはコントロールベクターを電気穿孔法によってCOS-7細胞内に導入

し、一過的に発現させた。これらの細胞からReg結合蛋白質を安定に発現するCHO細胞を単離した。細胞(7.5×10^5 個)をRPMI1640(Roswell Park Memorial Institute 1640)で洗い、 ^{125}I 標識ラットReg蛋白質(50ng/ml、 1.5×10^5 cpm/ml)の存在下において、種々の濃度の非標識ラットRegまたはヒトREG蛋白質とともに、1%ウシ胎児血清を含むRPMI1640中にて氷上で2時間インキュベートした。RPMI1640で3回洗った後、細胞を1mlの100mM Tris-HCl (pH7.6)、1mM EDTAおよび1% Triton X-100で可溶化した。可溶化物の放射活性をγ線計数機(Cobra、Packard)によって測定した。その結果、ラットReg結合蛋白質発現ベクターを導入したCOS-7細胞は ^{125}I 標識ラットReg蛋白質と結合し、この結合は非標識Reg蛋白質の添加によって減少した(図6)。

DNA/蛋白質データベースの相同性検索により、ラットReg結合蛋白質cDNA(配列番号: 3)および予想されるアミノ酸配列(配列番号: 4)には複数の外骨腫(EXT)ファミリー遺伝子、特にヒトEXT様遺伝子3(EXTL3)/EXT関連遺伝子1(EXTR1)(W. Van Hui et al., Genomics 47, 230 (1998); T. Saito et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 243, 61 (1998))との著明な相同性(アミノ酸同一性が97%を上回る)が認められることが明らかになり、このcDNAがヒトEXTL3/EXTR1のラット相同体(homologue)であることが示された。EXTL3/EXTR1遺伝子は相同性スクリーニングによってEXTファミリー遺伝子の一員として単離されたが、その生理的機能および病態生理学的意義は不明である。EXTL3/EXTR1は、C末端領域でEXT2およびEXT1との相同性(C末端の262アミノ酸がEXT2と52%、C末端の247アミノ酸がEXT1と40%)が認められることから(図4参照)、EXTファミリー(W. Van Hui et al., Genomics 47, 230 (1998); T. Saito et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 243, 61 (1998))に属すると考えられている。しかし、EXTL3/EXTR1のN末端領域(残基1~656)はEXTファミリー遺伝子の他のいずれのメンバーとも相同性が認められない。さらに、EXTL3/EXTR1のN末端領域は膜貫通ドメインを含んでいるが、ファミリーの他のメンバーはこのドメインを含まず、このため細胞表面

蛋白質であるとは考えられなかった。これに加えて、ラット膵島cDNA発現ライブラリーのスクリーニングで最初にReg結合蛋白質として単離された1.6kbp cDNAは、N末端領域のみを含んでいた（アミノ酸残基1～332）。したがって、Reg結合ドメインはN末端領域に含まれており、EXTL3/EXTR1以外のEXTファミリーのメンバーにはReg蛋白質との結合能はないとみなすことが妥当と思われる。

【実施例 10】 ラットReg結合蛋白質（ラットReg受容体）発現細胞のReg蛋白質による刺激効果

実施例 8 で構築したラットReg結合蛋白質（以後「ラットReg受容体」とも称す）発現ベクターをCHO細胞に導入して、受容体蛋白質を過剰発現する細胞系をいくつか樹立し、ラットReg蛋白質刺激による細胞内への5'-プロモ-2'-デオキシウリジン（BrdU）の取り込みを検討した。

HA-タグを付加したラットReg受容体発現ベクターをCHO細胞およびRINm5F細胞に導入した。10%ウシ胎児血清（Bio Whittaker、Walleville、Maryland）および250 μ g/mlのネオマイシン（Gibco）を加えたRPMI1640培地中で細胞を2週間培養した [S. Takasawa et al., J. Biol. Chem. 273, 2497 (1998)]。組換え蛋白質を高レベルに発現する安定形質転換体は、HAのイムノブロット解析によってスクリーニングし単離した。Reg受容体を発現する安定形質転換体を、種々の濃度のラットReg蛋白質の存在下において、1%ウシ胎児血清を加えたRPMI1640培地中で24時間培養した。培養終了の2時間前にBrdU（10 μ M）を培地に添加し、比色法による細胞増殖ELISAキット（Boeringer）を用いてBrdU取り込みを測定した。

1～300nMのラットReg蛋白質とともにインキュベートすると、EXTL3/EXTR1（ラットReg受容体）を発現する細胞系のBrdU取り込みは（#3および#22とも）著明に増加した（細胞系#3では $EC_{50}=4.01$ nM、細胞系#22では1.11nM、図7(A)）。CHO細胞系に対する増殖刺激効果を示したReg蛋白質の濃度は初代培養ラット膵島での値と一致しており（T. Watanabe et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 3589 (1994)）、このことからReg蛋白質による膵 β 細胞の増殖はEXTL3/EXTR1のラット相

同体によって媒介されることが示唆された。

^{125}I 標識ラットReg蛋白質はラットReg受容体発現CHO細胞と結合し ($K_a=4.41\text{nM}$)、非標識ラットReg蛋白質の濃度を高めることによって結合は置換された ($K_i=1.61\text{nM}$ 、図7(B)) (実施例9参照)。ラットReg蛋白質に関するヒル係数は $n_H=1.18$ と推定され、単一の均質な結合部位の集団との相互作用が考えられた。さらに、ラットReg蛋白質と70%のアミノ酸の同一性を示すヒトREG蛋白質 (K. Terazono, et al., J. Biol. Chem. 263, 2111 (1988); K. Terazono, T. Watanabe, Y. Yonemura, in Molecular biology of the islets of Langerhans, H. Okamoto, Ed. (Cambridge University Press, Cambridge, 1990), pp. 301-313) も、上記のラットReg受容体を発現するCHO細胞と結合した ($K_a=14.0\text{nM}$)。放射性標識したラットReg蛋白質のCHO細胞との結合は、ヒトREG蛋白質によっても置換されたが、置換にはより高い濃度を必要とした ($K_i=7.41\text{nM}$ 、図7(B))。以上の結果は、Reg結合蛋白質 (EXTL3/EXTR1) がReg蛋白質と結合する細胞表面Reg受容体であり、Reg蛋白質の増殖刺激シグナルを伝達することを強く示唆する。

[実施例11] ラットReg受容体の機能解析

Regは β 細胞増殖因子として認識されている (H. Okamoto, J. Mol. Med. 77, 74 (1999); T. Watanabe et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 3589 (1994); D. J. Gross et al., Endocrinology 139, 2369 (1998))。ラットインスリノーマ由来の β 細胞株であるRINm5F細胞にReg蛋白質を添加したところ、細胞のBrdUの取り込みが増加し (1.5~2倍)、Reg蛋白質の濃度依存的に細胞数を増加させることが判明した。RINm5F細胞において増殖を刺激するReg蛋白質の濃度はラット膵島初代培養におけるものと一致しており、Reg蛋白質は両者の細胞において同じ受容体を介して作用していることが示唆された。そこで、次にRINm5F細胞に実施例8で構築した発現ベクターを導入し、Reg受容体を過剰発現する細胞系をいくつか樹立し、これらの細胞を用いてReg蛋白質の作用を調べた。

0.3~300nMのラットReg蛋白質とともにインキュベートすると、受容体を発現す

る細胞系（細胞系#1、#6および#24）のBrdU取り込み（測定方法に関しては実施例10参照）は著明に増加した（図8A）。

Reg受容体を発現するこれらの安定形質転換体を、種々の濃度のラットReg蛋白質の存在下において、1%ウシ胎児血清を加えたRPMI1640培地中で24時間インキュベートした後、細胞増殖試薬であるテトラゾリウム塩4[-3-(4-ヨードフェニル)-2-(4-ニトロフェニル)-2H-5-テトラゾリオ]-1,3-ベンゼンジスルホネート（WST-1）（Boeringer）を含む溶液を培地に添加し、30分培養して、生細胞内のミトコンドリアデヒドロゲナーゼによるWST-1の切断を測定することにより細胞増殖を測定した。その結果、Reg受容体を発現するこれらのRINm5F細胞は、Reg蛋白質（0.3～100nM）の添加に応答して細胞数を増加させたが、細胞を高濃度のReg蛋白質とともにインキュベートした際には減少した（図8B）。

高濃度のReg蛋白質が、これらの細胞のアポトーシスを誘導している可能性を検証するため、このReg受容体を発現する安定形質転換体を、種々の濃度のラットReg蛋白質の存在下において、1%ウシ胎児血清を加えたRPMI1640培地中で24時間インキュベートした後、Apoptosis Screening Kit（Wako, Osaka, Japan）を用いて、TUNEL法[Y. Gavrieli et al., J. Cell Biol. 119, 493 (1992)]によりアポトーシスを検出した。

これらの細胞のアポトーシスを測定したところ、高濃度のReg蛋白質がReg受容体発現RINm5F細胞のアポトーシスを誘導したことが明らかになった（図8C）。以上の結果は、Reg受容体がReg蛋白質に応答して膵 β 細胞の増殖およびアポトーシスを媒介し、それによって β 細胞の量を安定的に維持していることを示している。

[実施例12] Reg受容体mRNAの発現解析

RNaseプロテクションアッセイにより、種々のラット組織および細胞におけるReg受容体mRNAの発現を検討した。

ラット再生膵島は以前記載したようにして調製した（K. Terazono, et al., J.

Biol. Chem. 263, 2111 (1988); K. Terazono, T. Watanabe, Y. Yonemura, in Molecular biology of the islets of Langerhans, H. Okamoto, Ed. (Cambridge University Press, Cambridge, 1990), pp. 301-313; Y. Yonemura et al., Diabetes 33, 401 (1984)). RNAは以前の記載に従って種々のラット組織および細胞株から単離した [T. Koguma et al., Biochem. Biophys. Acta 1223, 160 (1994); N. Noguchi et al., J. Biol Chem. 272, 3133 (1997); H. Okamoto et al., Meth. Enzymol. 280, 306 (1997)]. ラットReg受容体cDNA (配列番号: 3) のPstI/BglII断片をpBluescript SK(-) のPstI/BglII部位にサブクローニングし、HindIIIで直鎖化した後 T3 RNAポリメラーゼおよび [α - 32 P]CTPを用いて in vitro で転写させた。得られた0.45kb cRNAをプローブとして用いた。RNaseプロテクションアッセイは、RPA III kit (Ambion) を用いて説明書に従って行った。

図9Aに示す通り、Reg受容体mRNAは正常膵島、再生膵島およびRINm5F β 細胞において発現していた。正常膵島と比較して再生膵島におけるReg受容体の発現増強は認められず、このことから膵 β 細胞の量を増加させる β 細胞の再生および増殖は、受容体の発現ではなく、主としてReg蛋白質の発現によって調節される可能性が示唆された。この仮説は、Reg遺伝子が再生膵島で特異的に発現される遺伝子としてまず同定されたこと (K. Terazono, et al., J. Biol. Chem. 263, 2111 (1988); K. Terazono, T. Watanabe, Y. Yonemura, in Molecular biology of the islets of Langerhans, H. Okamoto, Ed. (Cambridge University Press, Cambridge, 1990), pp. 301-313; K. Terazono et al., Diabetologia 33, 250 (1990)) や、糖尿病緩解期にあるBB/Wor/Tkyラットの膵島 (C. Ishii et al., Endocr. J. 40, 269 (1993))、糖尿病発生活動期にあるNODマウスの膵島 (N. J. Baeza et al., Diabetes 45, 67 (1996)) などの一過性の β 細胞増殖期、および自己免疫性糖尿病のマウスモデルにおける分化・増殖期の膵管細胞 (β 細胞の前駆細胞と考えられている) (E. Anastasi et al., Eur. J. Endocrinol. 141, 644-52 (1999)) にもReg遺伝子の発現が認められるという観察結果と一致する。膵管細胞株の一つで

あり、Reg受容体を発現するARIP細胞（図9A、レーン6）も、Reg蛋白質依存的な様式で増殖することが報告されている（M. E. Zenilman et al., *Gastroenterology* 110, 1208 (1996); M. E. Zenilman et al., *Pancreas* 17, 256 (1998)）。Reg受容体mRNAの発現は心臓では認められなかったが、肝臓、腎臓、胃、小腸、大腸、副腎、下垂体および脳などでも認められ（図9B）、このことからReg-Reg受容体シグナル系が膵 β 細胞以外のさまざまな種類の細胞における細胞増殖およびアポトーシスの制御機構として関与する可能性が示唆された。事実、Reg受容体を発現するCHO細胞系はReg蛋白質に応答して増殖した（図7A）。さらに、このCHO細胞の細胞数はReg蛋白質濃度に依存して増加・減少した（測定方法に関しては実施例11参照）（図10）。

産業上の利用の可能性

本発明によりRegに結合する蛋白質（Reg受容体）が提供された。Reg蛋白質は膵臓の β 細胞の細胞増殖因子であり、同時に上皮細胞等においても細胞増殖活性を示すことが知られている。Reg結合蛋白質は膵臓 β 細胞においてReg蛋白質と結合することにより細胞増殖に必要なシグナルを細胞内に伝達する働きを持っており、膵臓 β 細胞はReg蛋白質とReg結合蛋白質の結合によって再生すると考えられる。このため、Reg結合蛋白質の細胞外ドメインの構造を解析し、これに結合するリガンドのアナログ物質を検索することにより、生理的な膵 β 細胞の増殖を誘発する「糖尿病治療薬」の開発が可能である。また、Reg蛋白質は膵臓細胞において β 細胞の過剰な増殖を引き起こさないため、インスリン投与のような過剰投与による低血糖を発現する可能性がないと考えられる。

請求の範囲

1. 下記 (a) から (i) のいずれかに記載のDNA。
 - (a) 配列番号：2に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質をコードするDNA。
 - (b) 配列番号：1に記載の塩基配列のコード領域を含むDNA。
 - (c) 配列番号：2に記載のアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸配列からなり、Reg蛋白質と結合する活性を有する蛋白質をコードするDNA。
 - (d) 配列番号：1に記載の塩基配列からなるDNAとハイブリダイズするDNAであって、Reg蛋白質と結合する活性を有する蛋白質をコードするDNA。
 - (e) 配列番号：4に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質をコードするDNA。
 - (f) 配列番号：3に記載の塩基配列のコード領域を含むDNA。
 - (g) 配列番号：4に記載のアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸配列からなり、Reg蛋白質と結合する活性を有する蛋白質をコードするDNA。
 - (h) 配列番号：3に記載の塩基配列からなるDNAとハイブリダイズするDNAであって、Reg蛋白質と結合する活性を有する蛋白質をコードするDNA。
 - (i) 配列番号：2または4に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質の部分ペプチドをコードするDNA。
2. 請求項1に記載のDNAによりコードされる蛋白質またはペプチド。
3. 請求項1に記載のDNAが挿入されたベクター。
4. 請求項3に記載のベクターを保持する宿主細胞。
5. 請求項4に記載の宿主細胞を培養し、該細胞で発現した組み換え蛋白質を、該培養細胞またはその培養上清から回収する工程を含む、請求項2に記載の蛋白質またはペプチドの製造方法。
6. 請求項2に記載の蛋白質またはペプチドに対する抗体。

7. 配列番号：1または3に記載の塩基配列からなるDNAまたはその相補DNAとハイブリダイズし、少なくとも15塩基の鎖長を有するポリヌクレオチド。

8. 請求項2に記載の蛋白質またはペプチドに結合する化合物のスクリーニング方法であって、

(a) 該蛋白質またはペプチドに被検試料を接触させる工程、

(b) 該蛋白質またはペプチドと被検試料との結合を検出する工程、および

(c) 該蛋白質またはペプチドに結合する化合物を選択する工程、を含む方法。

9. 請求項2に記載の蛋白質またはペプチドとReg蛋白質との結合を阻害する化合物のスクリーニング方法であって、

(a) 被検試料存在下で請求項2に記載の蛋白質またはペプチドとReg蛋白質とを接触させる工程、

(b) 請求項2に記載の蛋白質またはペプチドとReg蛋白質との結合を検出する工程、および

(c) 該結合を低下させる化合物を選択する工程、を含む方法。

10. 請求項9に記載の方法により単離されうる、請求項2に記載の蛋白質またはペプチドとReg蛋白質との結合を阻害する化合物。

11. 請求項2に記載の蛋白質の活性化により生じるシグナル伝達を促進または阻害する化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) 被検試料の存在下で請求項2に記載の蛋白質をその表面に発現する細胞にReg蛋白質を接触させる工程、

(b) Reg蛋白質による刺激に応答した該細胞の変化を検出する工程、および

(c) 被検試料非存在下において検出した場合（対照）比較して、該細胞の変化を増強または抑制する化合物を選択する工程、を含む方法。

12. 該細胞の変化が、細胞増殖活性または細胞のDNA合成活性の変化である、請求項11に記載の方法。

13. 請求項11または12に記載の方法により単離されうる、請求項2に記

載の蛋白質の活性化により生じるシグナル伝達を促進または阻害する化合物。

14. 請求項1に記載のDNA、請求項2に記載の蛋白質またはペプチド、請求項3に記載のベクター、請求項6に記載の抗体、請求項10に記載の化合物、または請求項13に記載の化合物を含む薬剤。

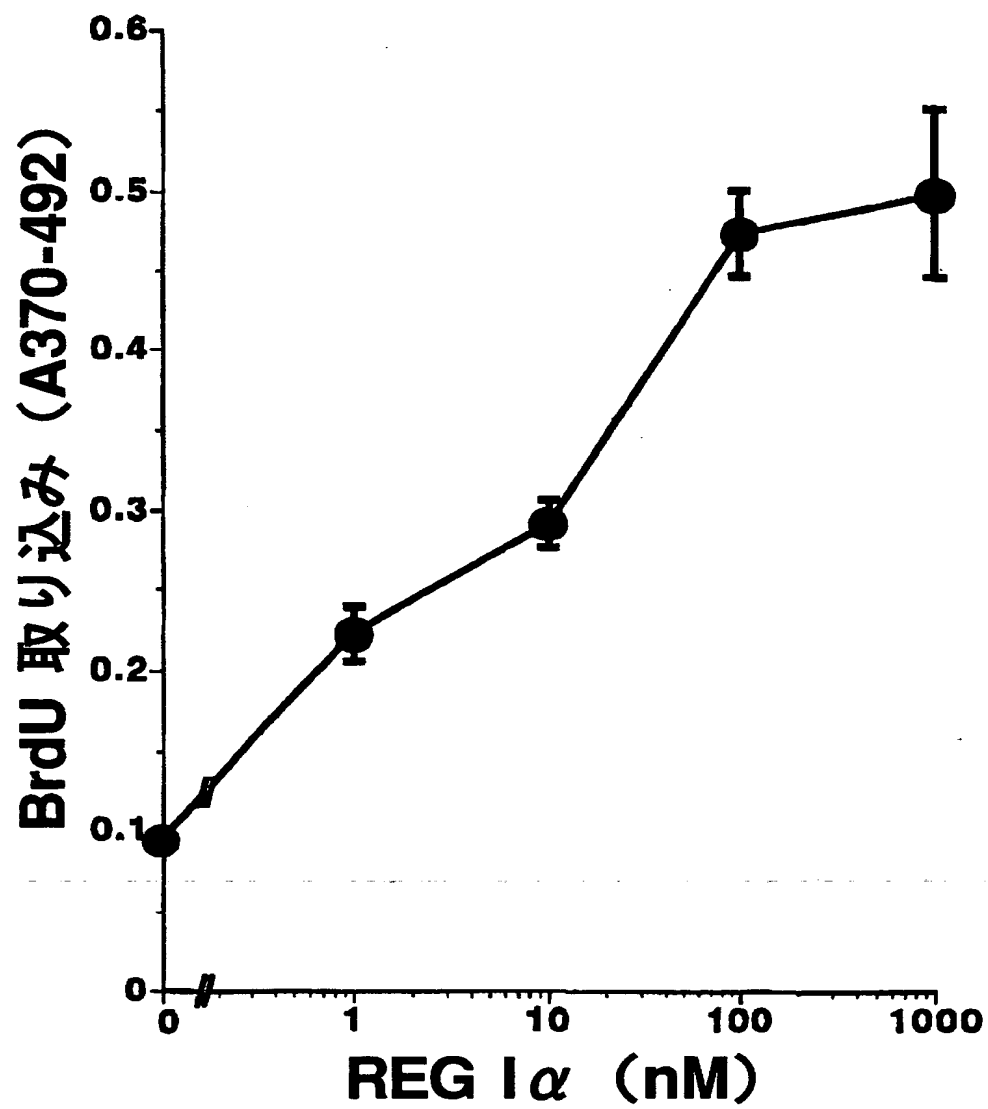
15. Reg結合剤、Reg蛋白質に応答した細胞内シグナル伝達の調節剤、細胞増殖調節剤、DNA合成調節剤、およびアポトーシス調節剤からなる群より選択される、請求項14に記載の薬剤。

16. 糖尿病治療薬である、請求項14または15に記載の薬剤。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

1 / 10

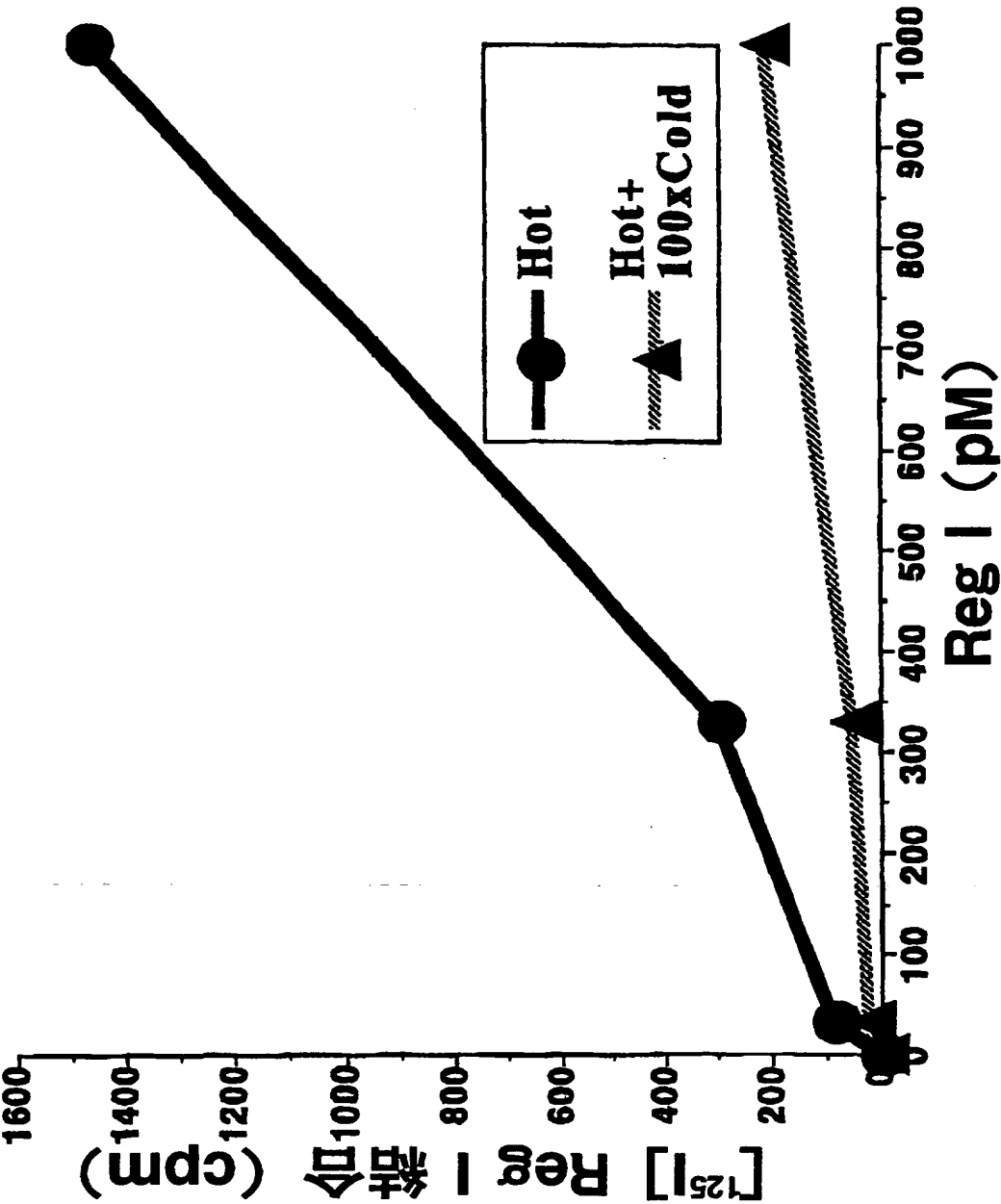
図 1



THIS PAGE BLANK (USPTO)

2 / 1 0

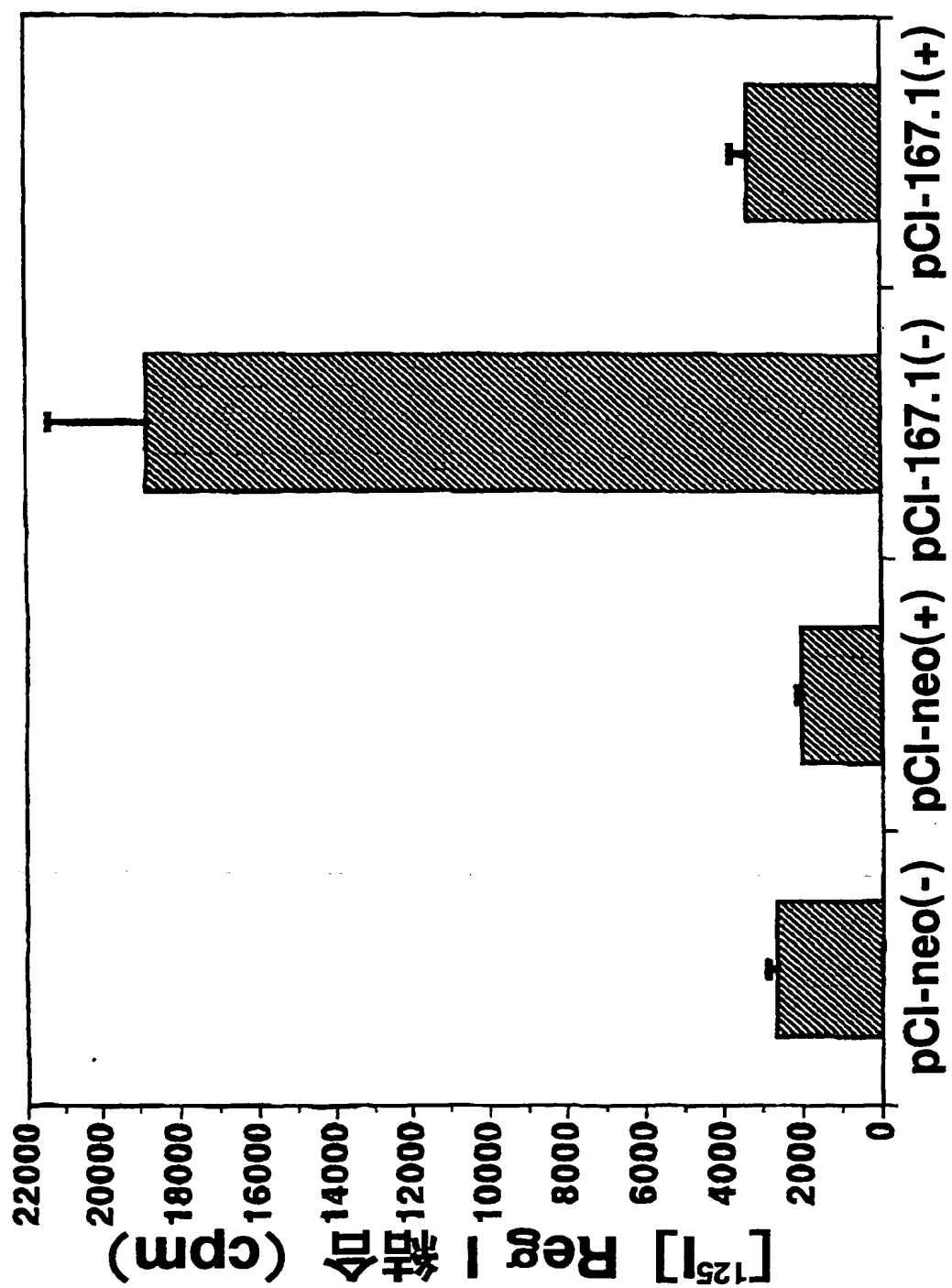
図 2



THIS PAGE BLANK (USPTO)

3 / 10

図 3



THIS PAGE BLANK (USPTO)

☒ 4 つづ

膜貫通ドメイン

MICYMLANGGVNGGQTCMLWENRIRUWLSFIFILVFFFLIAHVLTTDEAGGRIFGFRAGNELCEKHWLDCHRESVS 90
A.....V.....V.....

TEXT3
 HEXTL3
 HEXT2
 HEXT1
 HEXTL1
 HEXTL2

BELLOPAKROELANSELAKINLCEACKSIEKAKODLLOLQNVISQTESHSEKELMAQNPKISLPILPEKODAGLPFPKVTGCRUH 180
A.....A.....

TEXT3
 HEXTL3
 HEXT2
 HEXT1
 HEXTL1
 HEXTL2

1

NCDYSRCPLTSGFVAVYDSQFAPGSLDFLNVKQAFQATVRANVVTENALACLHVLVGEIQEPAVLQPADLEKQUSLPHARTDG 270
Y.....V.....D.....I.....M.....V.....R.....E.....Y.....
 -----MCASVKYNIQGP.LIHPAKIKRIYV.TLFSI..L.L.ATCGFMPHSIESNDANVERSI 63
 QAKGYFIL.SA.SCLALLFYPGGLQFRASHSHSRREHSENGELHHPSPDHFWRPPEP.RPFPADQLENEEDSSVHISPGQRDANSS 91
 -----H.SKRRUKSLW.ALSASH.LLVLLG. 26

TEXT3
 HEXTL3
 HEXT2
 HEXT1
 HEXTL1
 HEXTL2

HNHVIINLSRKSDTQALLNVSTGRAMVQSTFYAAQYRAGFDLVVSLVHAMSENEFMEIPQVPVKRYLPTFQGERIPESLSSLOEA 360
TV...P.....
 RDVPVR.PAD.PIPEBDLSCHMHCEVYRCGNEPKIKVITYALKVVDGVSUNTSIRENEELMAISDSYTTDDINRACLF 153
 TYKGGKCRMESCFDET.CKNGFVVVYP.QKGEKIAESYQNT.AATGSRFTYSDPSQACLVLSLDTLDRDQLSPQVYN...KV.SL 181
 FSLRLA.FPRPRGASQGFHWLD.ELL..FSQPGELPEDAVSPQAPHGSSOMIESCFDTSEKCEGELKV.VYPAVGTI.ETHRRIL. 116

TEXT3
 HEXTL3
 HEXT2
 HEXT1
 HEXTL1
 HEXTL2

THIS PAGE BLANK (USPTO)

4 4 4

RSTFEEMBEDPPADYDRI IATIKAVQSKDQJLVETICKNPKPSLPTEWALOGERRERLELKLSTFALLITPGPSSLISSGCATR 450
R.V..... 450
 VPSIDVLNONTLRIKETANQAQLSRH.RGNML.FNMLPGGP.DENVALDPRDRALLAGGFSWITYRQGVNSIPVYSPL.AEVDLP 243
 HLWNGRNLIFNL.SGTWPDYTED.GEDIGQAM.AKALISITENFRPNFVNISIPFSKHPRITGGERGFLKFNIT.PIUKYMLVPKCKRY 271
 STEGSRFYTF.S.GACILLLLS.D.QTECCSSMP.QANRGR.HLVL.R.HPARCFRTFQLQAMVAEA.PTVDSFR.FDWA.FFLPR.HP 206

 LPEALEVGAVPVVLGEQVQLPYHDMQANEALVVPKPRVTEVHFLLPSLSDSOLAMRQRGRFLWETYSTADSIENIVIAMIRTRIQI 540
Q..... 540
 EKGPRQRYFLSSQNGLHPB.REDEALQNKGESVLVKCTN.SEGVL.SVNRCHKH.VEDYPOVLQENTFCVLRGARLQOAVLSD 333
 .TGIGSDTRNALVHANGEDVLLTTCCHKQWQKH.DSFCIRDNTEYKY.YREMLNATFCLVPRGRRUGSPREFEALQ.ACVPVMLS 361
 .RGARQGIROHSEPOG.A.LALEERGGHRTADTGGSSACHDCEQDPFGQJURQETLPNATFCLISGRPEAASRP.QALOGCIP 296

 PAAPTRIEVAEIPHRSGKAAGIDPNVADNGDLDGPVETEPPTASPKYLRNFTLVITDCVRSNNSAPGFFHLFHTTETDVLPSAEKFL 630
A.....R.....P.....C..... 630
 VLQACVP.VIADSVILPFFSEVL.MKR.SVVVPEKMSDYSILQ.IPRQIEMQRQARMWEAYFQSİKALALA.LQINDRIYPTAA 423
 NGWELPFSSEVTINWQAAVTIGDERULLQIPSTIRSHQDKILALRQOTQ.MEAYFSSVEKIVLITLLEIQQRI.K.IERNSLIANKHPGQ 451
 VLLSP.W.LPFFSEVIDMT..IVADERLPLQV.NALQESPAVVALRQOTQ.LADAYFSSVEKIVHTITLLEVIQDIRICTSAN..LIANS 386
 -----MRCHICKL.GRWMTIRVLRLS.VITLVLVAGALVALL.SVKEDKMLMFRREIKSQGKSTM 63

 GSGTGFPRIGGAGGSGKEFQALGQVQREQFTVMULTYBEEVLANSJERLNGLPYANKVVMWNSP-KLPSEDLLWPDIG---VPTM 716
P..... 716
 I.VEBANDPPAVKH..VENPLFLPLPP.SGQ..ATV...D.V.S.FRVITEVKV.S.S.LL...NQN.N.P..S...K.R....LK 510
 LFLVLQYSSYL.DFPYTYANGLKPPSKFTAVTHA.TPLVSSQSPVLKL.VANAKSQ.CAQIY.L.CD..PLPAKHR..ATA-----VV 541
 PP-ALLALSTFSTSPQDEP.YYLQQ.BRPEER.SALIWGPPQPPFLKLQIQA.SCHCAQIL.L.SNE-R--PLPSR..ETA-----LT 474
 .AL-ALL.SVKEDKMLMFRREIKSQ.KSTNDS..LI.Q..N.TLL.LKL.NINQAV.N.H..I....NI-GEKAP.E..NSL.PHP.I.VI 122

THIS PAGE BLANK (USPTO)

4/2/10

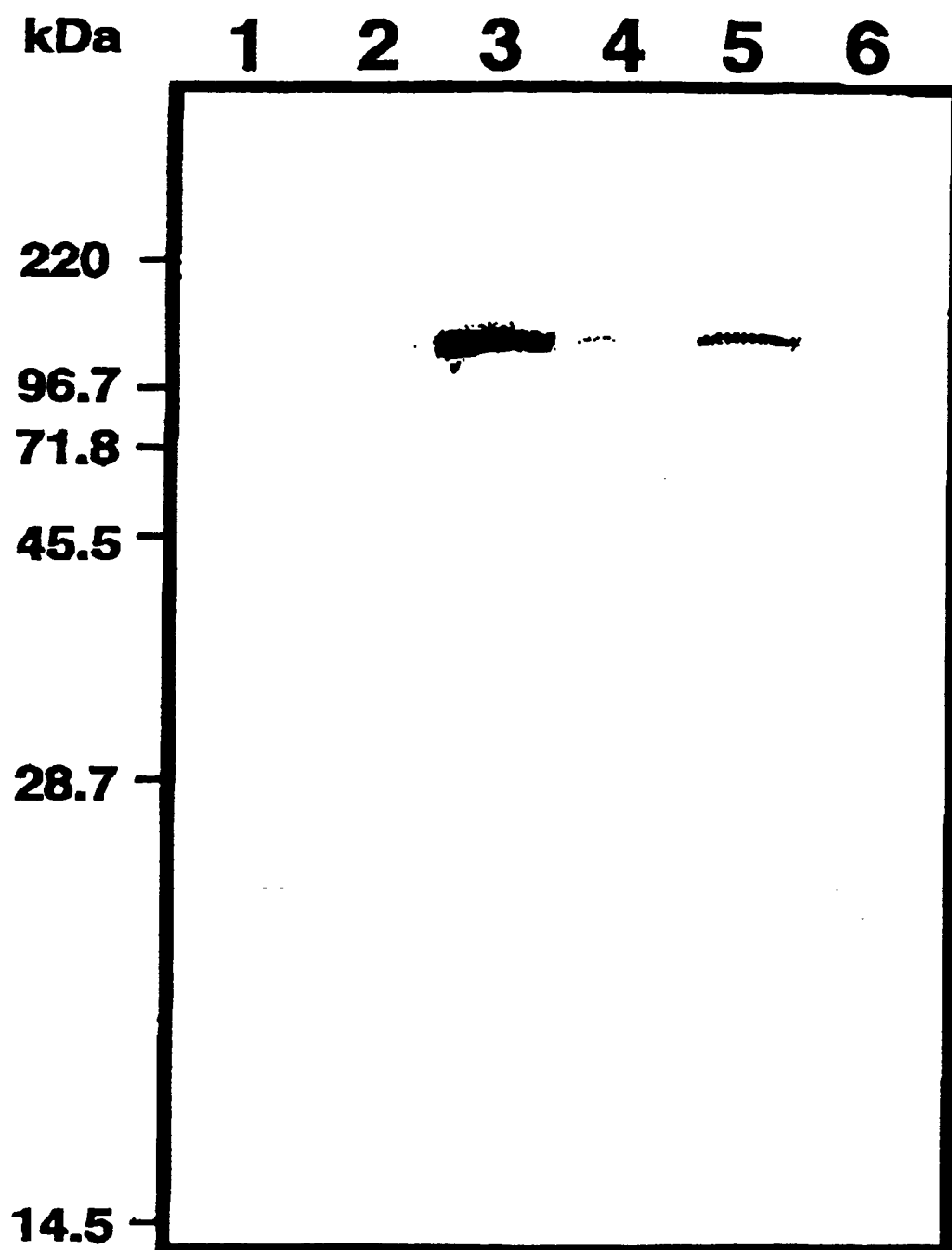
図 4 並び

TEXT13	WRTKNSIANRFLPANEIETEALISLDD-AHLRHEINFGFRVREANRULVGFGRUH---AMD1-FHQSW---LYNSNYSCELSMV	798
TEXT13	798
TEXT2AB.K.S...F.YD.....V.A....IM.TS..LQ..YE...FP..L..Y...L...H-EAK...K.E.EWTV.V... 593	
TEXT1	..JEG.SKWS8....YDN.I.D.V..L.E..TV.STT.VD.A.T..QSPFE...Y.A.S....F..N-SKER.....G.T.KATNDY... 619	
TEXT11	..IDGRK-VSD...Y.YST.R.D...L.AR-SS.STS.VD.A.L..QSPFE.N...LTSS.....F..E.A.CG....G-TAERTN.F... 551	
TEXT12	FRQOTA.RMR..LQVFP.L.N.V.MV...TLISTPDLV.A.S..QJFP.Q...VP.K.VSTSSG.YSYG.FEPDAFG.GXGDQY... 211	
TEXT13	LACAAFFHKYAYLYSYVMPQAIRDMVDEYINCEJIANFLNS-HITRKP-----PIKV--TSKWTR-----CPGC--PQALSHDDSHFH	874
TEXT13	874
TEXT2Y...FN...T.K..CD.KW...AHM.....A-NV.G.A-----V...P.KK.K.....E.TAIDG..L.QT.MV	671
TEXT1IV.....H...HYL.ASLKNM..OLA.....L.....AV.KL.....QKQYKEMACQTS--RASRWA.PD..A	697
TEXT11	..T...Y.R..HT.FTHSL.K.L.TLA..APT.V.VL...I.A-AV.KL.....PYGQRQEA-----APLA---CGPCPRPKPPA	628
TEXT12	..I..S...NSK.LE.FQ-RQ.A.VHALI.DIQ..D.....IIAK..GKTSIGIFVK.VMW--DNLEKET-----NS.Y--S-GMW.RAB.AL	290
TEXT13	ERHKCINFFVKVYGIMPLLYTQFRVDSVLFKTRLPHTKCFKFI	919 (配列番号 : 4)
TEXT13	919 (配列番号 : 5)
TEXT2	..SE...K.AS.F.T...KVVEH.A.P..Y.DOF..E.L.S.PN.GSL	718 (配列番号 : 6)
TEXT1	Q.Q8.H.T.ASWF.....IHS.H.L.P....DQVSILAK.YRDIERL	746 (配列番号 : 7)
TEXT11	PAPD...QIAAAF.H...SSRL.L.P....DPVSQQRK.YRSLEKP	676 (配列番号 : 8)
TEXT12	Q.SY...KL.NI.DS...R.SNIMLSQFG.PYANYKR.I	330 (配列番号 : 9)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

5 / 10

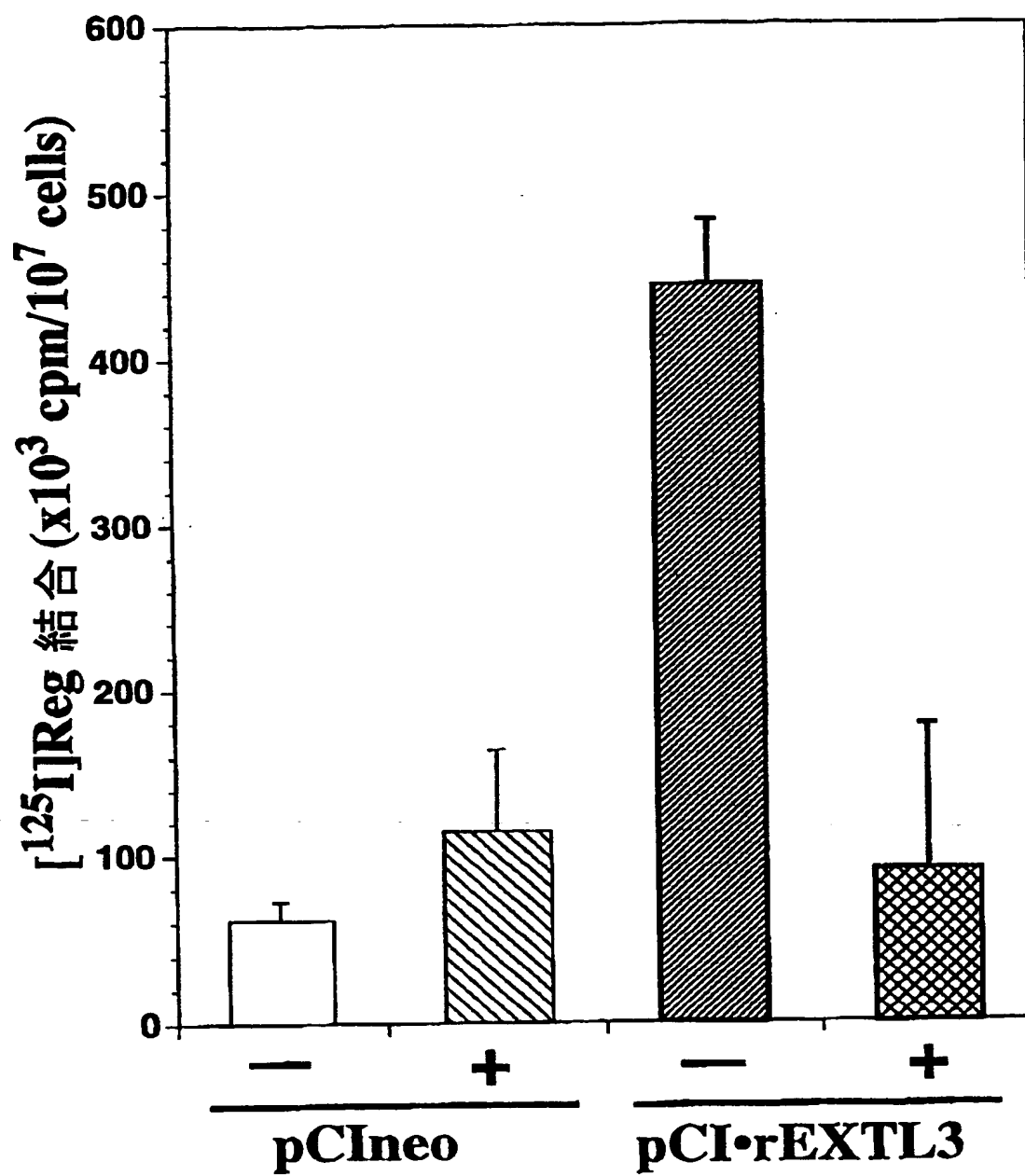
☒ 5



THIS PAGE BLANK (USPTO)

6 / 10

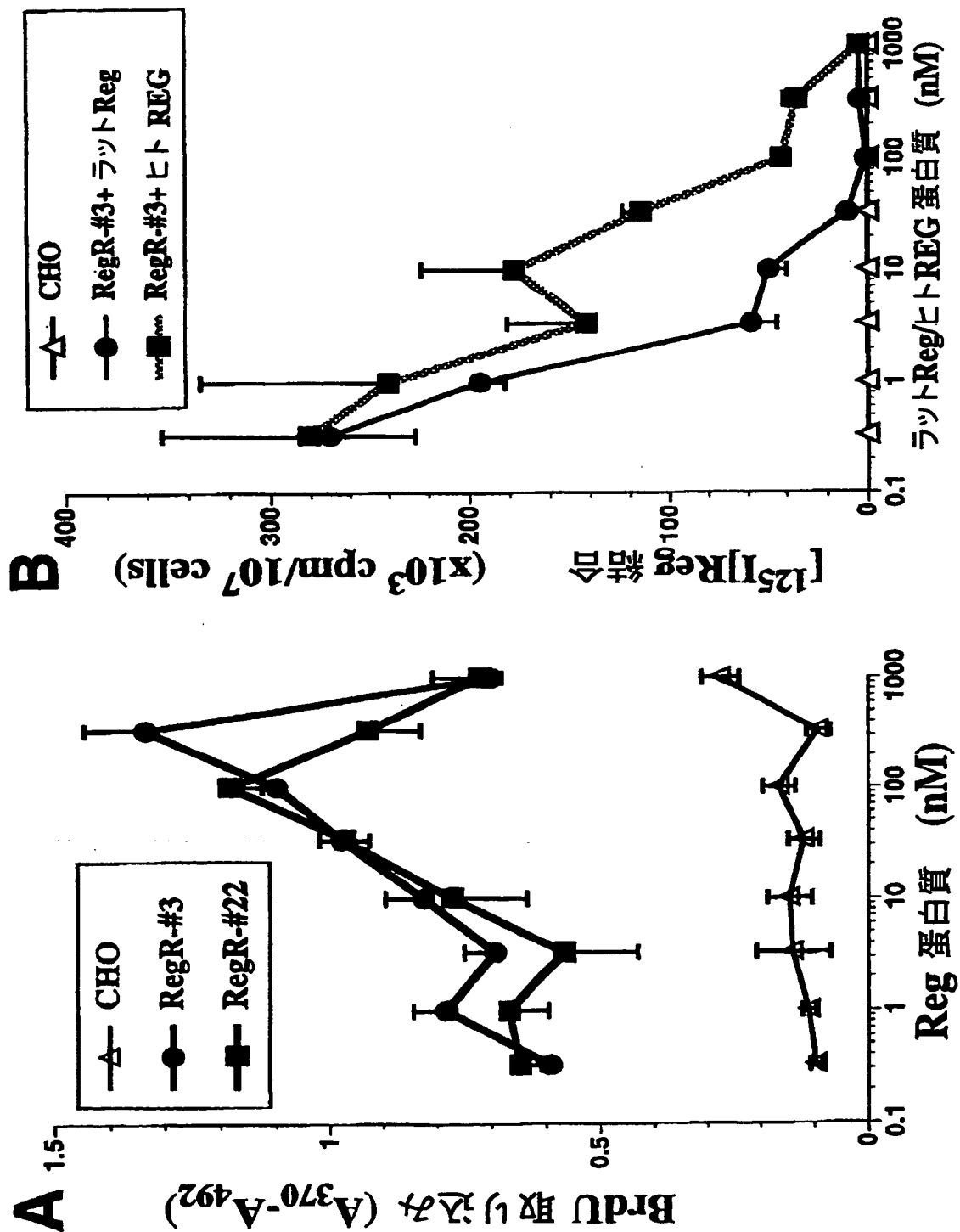
図 6



THIS PAGE BLANK (USPTO)

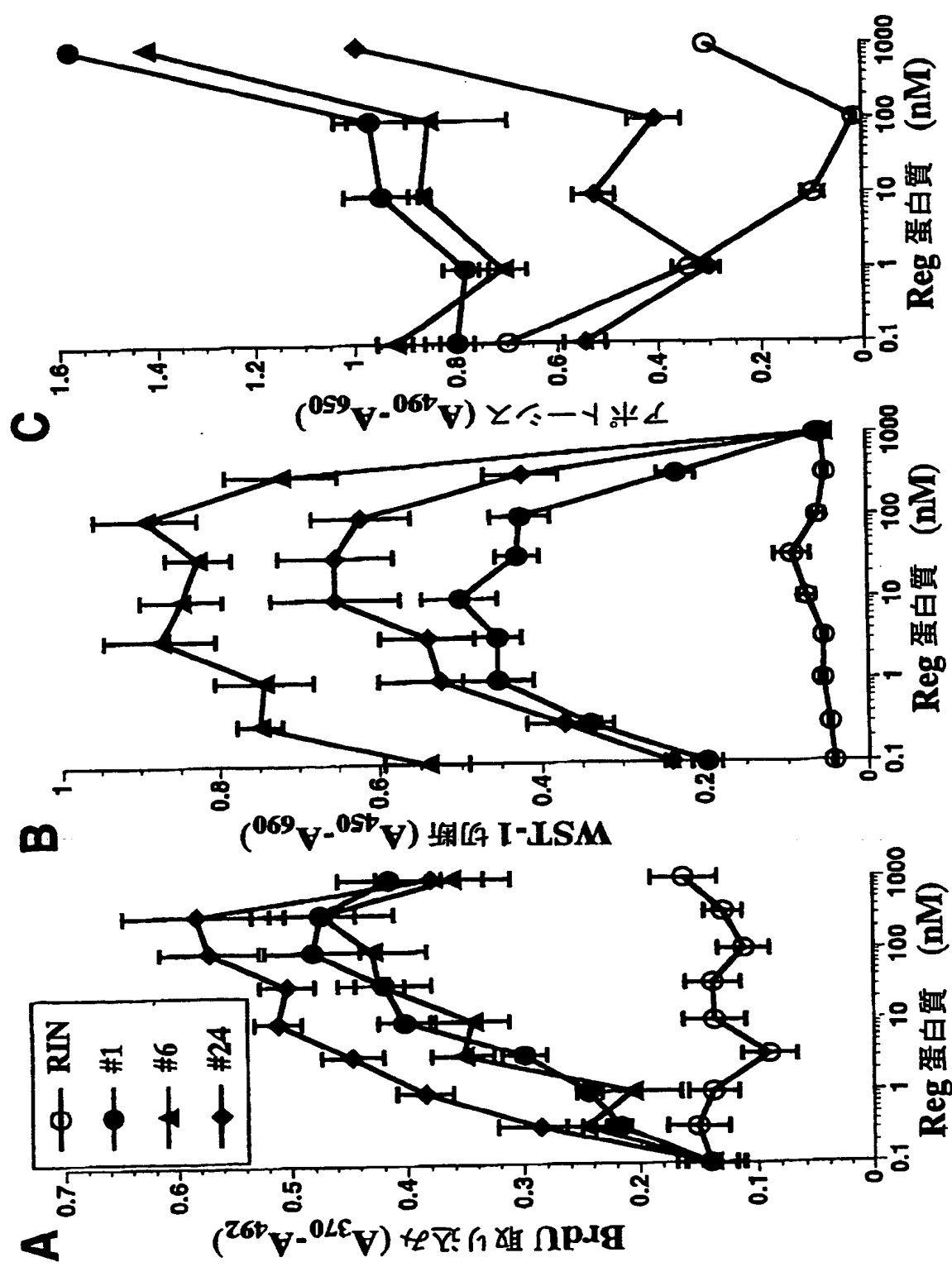
7 / 10

図 7



THIS PAGE BLANK (USPTO)

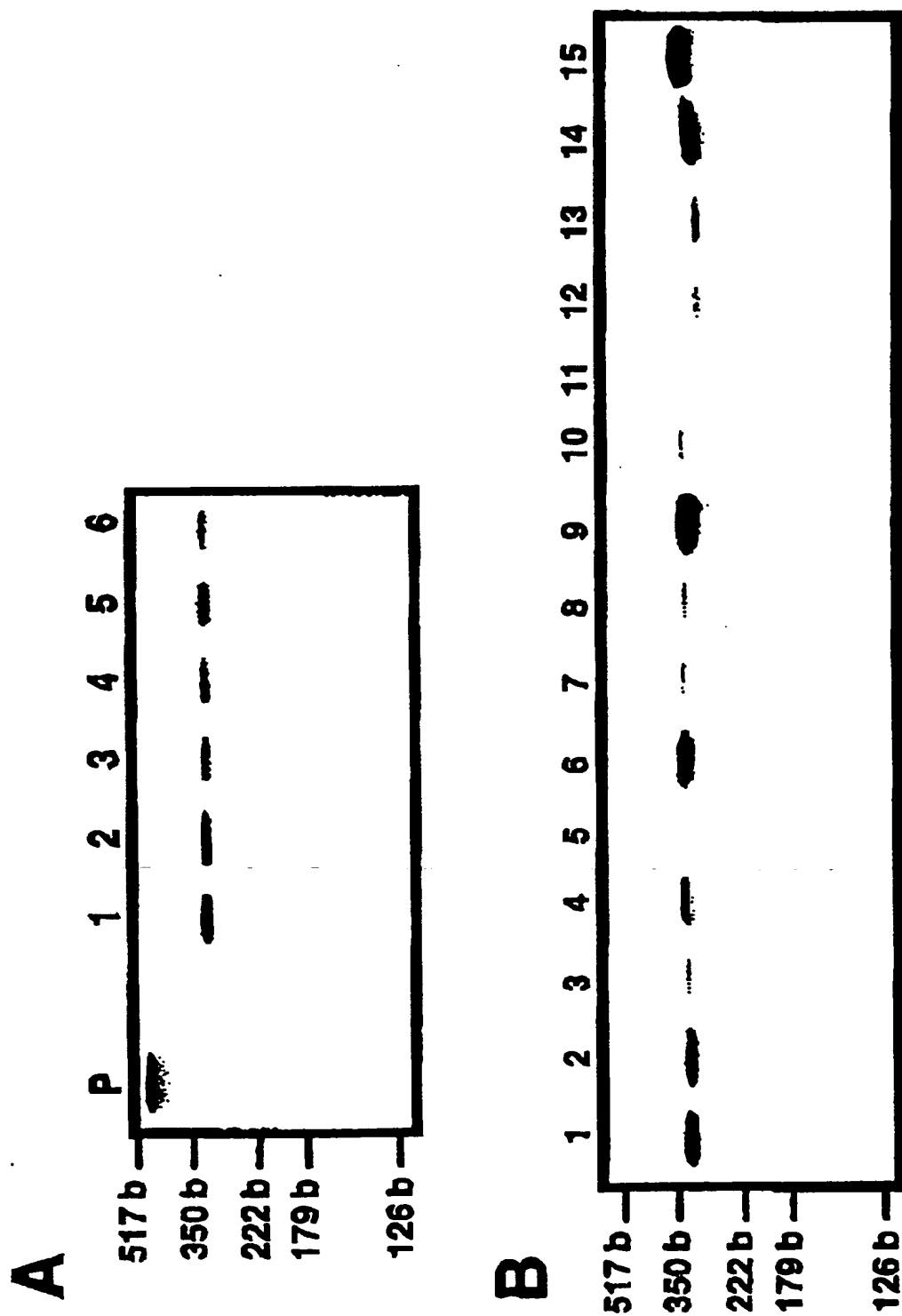
図 8



THIS PAGE BLANK (USPTO)

9 / 10

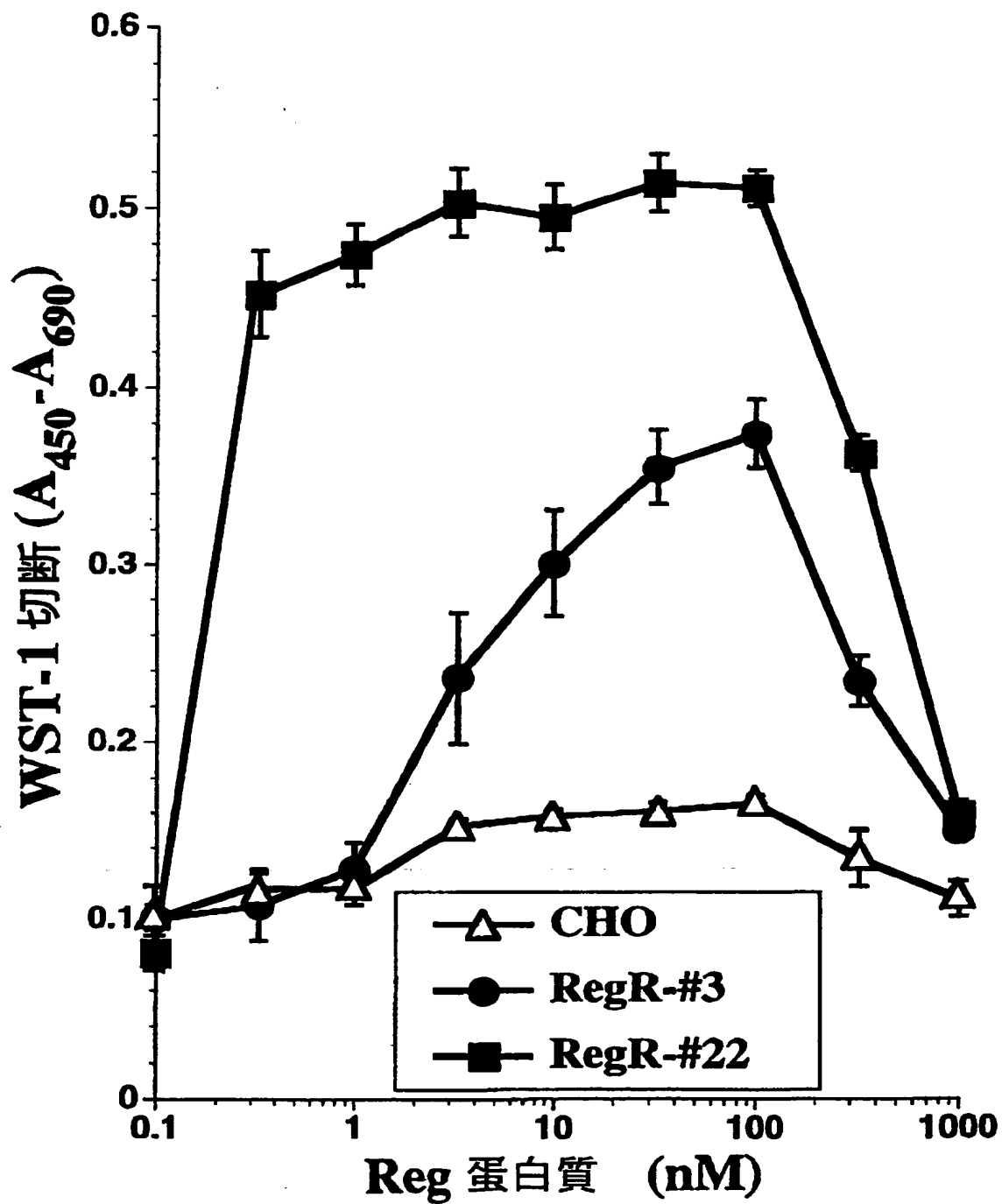
図 9



THIS PAGE BLANK (USPTO)

10 / 10

図 10



THIS PAGE BLANK (USPTO)

SEQUENCE LISTING

<110> OKAMOTO, Hiroshi

<120> Reg binding proteins

<130> OKT-101PCT

<140>

<141>

<150> JP 1999-164488

<151> 1999-06-10

<160> 9

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 1599

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

<220>

<221> CDS

<222> (168)..(1259)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

2/52

<400> 1

tcagcgagga aaatgaaatt cccattttat ttggtgcctt gtgcagggag cacactgac 60

cctctagaac cttgtgtgtg aaaaagaggt cgagttttgt caaacagact catggttatg 120

gcaagtgate cgacgtgacc agagtgggca agagccacag tgaactc atg aca ggc 176

Met Thr Gly

1

tat acc atg ttg cgg aat ggg gga gtg ggg aac ggt ggt cag acc tgt 224

Tyr Thr Met Leu Arg Asn Gly Gly Val Gly Asn Gly Gly Gln Thr Cys

5

10

15

atg ctg cgc tgg tcc aac cgc atc cgg ctg acc tgg ctg agt ttc acg 272

Met Leu Arg Trp Ser Asn Arg Ile Arg Leu Thr Trp Leu Ser Phe Thr

20

25

30

35

ctg ttc atc atc ctg gtc ttc ttc ccc ctc att gcc cac tat tac ctc 320

Leu Phe Ile Ile Leu Val Phe Phe Pro Leu Ile Ala His Tyr Tyr Leu

40

45

50

acc act ctg gat gag gca gat gag gcc ggc aag cgc atc ttt ggc ccc 368

Thr Thr Leu Asp Glu Ala Asp Glu Ala Gly Lys Arg Ile Phe Gly Pro

55

60

65

THIS PAGE BLANK (USPTO)

3/52

cgg gct ggc aac gag ctc tgt gag gta aag cac gtc cta gat ctt tgt 416

Arg Ala Gly Asn Glu Leu Cys Glu Val Lys His Val Leu Asp Leu Cys

70

75

80

cgg atc cgc gag tct gtg agc gaa gag ctt cta cag cta gaa gcc aag 464

Arg Ile Arg Glu Ser Val Ser Glu Glu Leu Leu Gln Leu Glu Ala Lys

85

90

95

cgg cag gag ctg aac agc gag att gcc aag cta aac ctc aag att gaa 512

Arg Gln Glu Leu Asn Ser Glu Ile Ala Lys Leu Asn Leu Lys Ile Glu

100

105

110

115

gcc tgt aag aag agt ata gag aac gcc aag cag gac ctg ctg cag ctc 560

Ala Cys Lys Lys Ser Ile Glu Asn Ala Lys Gln Asp Leu Leu Gln Leu

120

125

130

aag aat gtc att agc cag aca gag cac tcc tac aag gag ctg atg gcc 608

Lys Asn Val Ile Ser Gln Thr Glu His Ser Tyr Lys Glu Leu Met Ala

135

140

145

cag aac cag ccc aaa ctg tca ctg ccc atc cgg ctg ctc cct gag aag 656

Gln Asn Gln Pro Lys Leu Ser Leu Pro Ile Arg Leu Leu Pro Glu Lys

150

155

160

gat gac gct ggc ctt cca ccc ccc aag gtc act cgg ggt tgc cgg cta 704

Asp Asp Ala Gly Leu Pro Pro Pro Lys Val Thr Arg Gly Cys Arg Leu

THIS PAGE BLANK (USPTO)

165	170	175	
cac aac tgc ttc gat tac tct cgt tgc cct ctg acg tct ggc ttt cct			752
His Asn Cys Phe Asp Tyr Ser Arg Cys Pro Leu Thr Ser Gly Phe Pro			
180	185	190	195
gtc ttc gtc tat gac agt gac cag ttt gcc ttt ggg agc tac ctg gac			800
Val Phe Val Tyr Asp Ser Asp Gln Phe Ala Phe Gly Ser Tyr Leu Asp			
	200	205	210
cct ttg gtc aag cag gct ttt cag gct aca gtg aga gcc aac gtt tat			848
Pro Leu Val Lys Gln Ala Phe Gln Ala Thr Val Arg Ala Asn Val Tyr			
	215	220	225
gtt aca gaa aat gca gcc atc gcc tgc ctg tat gtg gtg tta gtg gga			896
Val Thr Glu Asn Ala Ala Ile Ala Cys Leu Tyr Val Val Leu Val Gly			
230	235	240	
gag ata caa gag ccc gct gtg ctg cag cct gcc gac ctt gag aag cag			944
Glu Ile Gln Glu Pro Ala Val Leu Gln Pro Ala Asp Leu Glu Lys Gln			
245	250	255	
ctg cat tct ctg cca cac tgg agg aca gac gga cac aac cat gtc atc			992
Leu His Ser Leu Pro His Trp Arg Thr Asp Gly His Asn His Val Ile			
260	265	270	275

THIS PAGE BLANK (USPTO)

atc aat ctg tcc cgg aag tca gac aca caa aat tta ctg tac aat gtc 1040

Ile Asn Leu Ser Arg Lys Ser Asp Thr Gln Asn Leu Leu Tyr Asn Val

280

285

290

agt aca ggt cgg gcc atg gtg gcc cag tct acc ttc tat gct gcc cag 1088

Ser Thr Gly Arg Ala Met Val Ala Gln Ser Thr Phe Tyr Ala Ala Gln

295

300

305

tac aga gct ggc ttt gac ttg gtt gtg tca cca ctt gtc cat gcc atg 1136

Tyr Arg Ala Gly Phe Asp Leu Val Val Ser Pro Leu Val His Ala Met

310

315

320

tct gaa ccc aac ttc atg gaa atc cca cgt gta act att ttt tca ctt 1184

Ser Glu Pro Asn Phe Met Glu Ile Pro Arg Val Thr Ile Phe Ser Leu

325

330

335

ggg aga ggt gag gaa gaa caa gag aag ctg ggg gtg tgg aga ggc aga 1232

Gly Arg Gly Glu Glu Glu Gln Glu Lys Leu Gly Val Trp Arg Gly Arg

340

345

350

355

ccc ccc cca ggc tgg ggt gct ggc ccc tagactaggg tgctgacccc 1279

Pro Pro Pro Gly Trp Gly Ala Gly Pro

360

tgggctgggg tgctgcgtgc tacctccac tgtgaaatcg atggtgctca caattgtctc 1339

THIS PAGE BLANK (USPTO)

6/52

ttgtaatgta tgtgattttt ttttaaggag aaaaagaaac tatttaagat tctgaagggtg 1399

ctactatttt tggtgccaca ggctttaaaag aaactttctg agtgggtggg gccttgccca 1459

cttatctttc tctcctccaa atgaggagtt aaaaatgtta ctaaattgcc cgcacgtgta 1519

atccgctgaa aagaaaaaaaa aaaaagaaaa aaaaaaggaa ggaaagaagg aaagaaggaa 1579

ggaaggaagg aaggaaagga 1599

<210> 2

<211> 364

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 2

Met Thr Gly Tyr Thr Met Leu Arg Asn Gly Gly Val Gly Asn Gly Gly

1

5

10

15

Gln Thr Cys Met Leu Arg Trp Ser Asn Arg Ile Arg Leu Thr Trp Leu

20

25

30

Ser Phe Thr Leu Phe Ile Ile Leu Val Phe Phe Pro Leu Ile Ala His

35

40

45

THIS PAGE BLANK (USPTO)

7/52

Tyr Tyr Leu Thr Thr Leu Asp Glu Ala Asp Glu Ala Gly Lys Arg Ile

50

55

60

Phe Gly Pro Arg Ala Gly Asn Glu Leu Cys Glu Val Lys His Val Leu

65

70

75

80

Asp Leu Cys Arg Ile Arg Glu Ser Val Ser Glu Glu Leu Leu Gln Leu

85

90

95

Glu Ala Lys Arg Gln Glu Leu Asn Ser Glu Ile Ala Lys Leu Asn Leu

100

105

110

Lys Ile Glu Ala Cys Lys Lys Ser Ile Glu Asn Ala Lys Gln Asp Leu

115

120

125

Leu Gln Leu Lys Asn Val Ile Ser Gln Thr Glu His Ser Tyr Lys Glu

130

135

140

Leu Met Ala Gln Asn Gln Pro Lys Leu Ser Leu Pro Ile Arg Leu Leu

145

150

155

160

Pro Glu Lys Asp Asp Ala Gly Leu Pro Pro Pro Lys Val Thr Arg Gly

165

170

175

Cys Arg Leu His Asn Cys Phe Asp Tyr Ser Arg Cys Pro Leu Thr Ser

180

185

190

THIS PAGE BLANK (USPTO)

8/52

Gly Phe Pro Val Phe Val Tyr Asp Ser Asp Gln Phe Ala Phe Gly Ser

195

200

205

Tyr Leu Asp Pro Leu Val Lys Gln Ala Phe Gln Ala Thr Val Arg Ala

210

215

220

Asn Val Tyr Val Thr Glu Asn Ala Ala Ile Ala Cys Leu Tyr Val Val

225

230

235

240

Leu Val Gly Glu Ile Gln Glu Pro Ala Val Leu Gln Pro Ala Asp Leu

245

250

255

Glu Lys Gln Leu His Ser Leu Pro His Trp Arg Thr Asp Gly His Asn

260

265

270

His Val Ile Ile Asn Leu Ser Arg Lys Ser Asp Thr Gln Asn Leu Leu

275

280

285

Tyr Asn Val Ser Thr Gly Arg Ala Met Val Ala Gln Ser Thr Phe Tyr

290

295

300

Ala Ala Gln Tyr Arg Ala Gly Phe Asp Leu Val Val Ser Pro Leu Val

305

310

315

320

His Ala Met Ser Glu Pro Asn Phe Met Glu Ile Pro Arg Val Thr Ile

THIS PAGE BLANK (USPTO)

9/52

325

330

335

Phe Ser Leu Gly Arg Gly Glu Glu Glu Gln Glu Lys Leu Gly Val Trp

340

345

350

Arg Gly Arg Pro Pro Pro Gly Trp Gly Ala Gly Pro

355

360

<210> 3

<211> 3198

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

<220>

<221> CDS

<222> (5)..(2761)

<400> 3

actc atg aca ggc tat acc atg ttg cgg aat ggg gga gtg ggg aac ggt 49

Met Thr Gly Tyr Thr Met Leu Arg Asn Gly Gly Val Gly Asn Gly

1

5

10

15

ggc cag acc tgt atg ctg cgc tgg tcc aac cgc atc cgg ctg acc tgg 97

Gly Gln Thr Cys Met Leu Arg Trp Ser Asn Arg Ile Arg Leu Thr Trp

20

25

30

THIS PAGE BLANK (USPTO)

10/52

ctg agt ttc acg ctg ttc atc atc ctg gtc ttc ttc ccc ctc att gcc 145

Leu Ser Phe Thr Leu Phe Ile Ile Leu Val Phe Phe Pro Leu Ile Ala

35

40

45

cac tat tac ctc acc act ctg gat gag gca gat gag gcc ggc aag cgc 193

His Tyr Tyr Leu Thr Thr Leu Asp Glu Ala Asp Glu Ala Gly Lys Arg

50

55

60

atc ttt ggc ccc cgg gct ggc aac gag ctc tgt gag gta aag cac gtc 241

Ile Phe Gly Pro Arg Ala Gly Asn Glu Leu Cys Glu Val Lys His Val

65

70

75

cta gat ctt tgt cgg atc cgc gag tct gtg agc gaa gag ctt cta cag 289

Leu Asp Leu Cys Arg Ile Arg Glu Ser Val Ser Glu Glu Leu Leu Gln

80

85

90

95

cta gaa gcc aag cgg cag gag ctg aac agc gag att gcc aag cta aac 337

Leu Glu Ala Lys Arg Gln Glu Leu Asn Ser Glu Ile Ala Lys Leu Asn

100

105

110

ctc aag att gaa gcc tgt aag aag agt ata gag aac gcc aag cag gac 385

Leu Lys Ile Glu Ala Cys Lys Lys Ser Ile Glu Asn Ala Lys Gln Asp

115

120

125

ctg ctg cag ctc aag aat gtc att agc cag aca gag cac tcc tac aag 433

THIS PAGE BLANK (USPTO)

11/52

Leu Leu Gln Leu Lys Asn Val Ile Ser Gln Thr Glu His Ser Tyr Lys

130

135

140

gag ctg atg gcc cag aac cag ccc aaa ctg tca ctg ccc atc cgg ctg 481

Glu Leu Met Ala Gln Asn Gln Pro Lys Leu Ser Leu Pro Ile Arg Leu

145

150

155

ctc cct gag aag gat gac gct ggc ctt cca ccc ccc aag gtc act cgg 529

Leu Pro Glu Lys Asp Asp Ala Gly Leu Pro Pro Pro Lys Val Thr Arg

160

165

170

175

ggt tgc cgg cta cac aac tgc ttc gat tac tct cgt tgc cct ctg acg 577

Gly Cys Arg Leu His Asn Cys Phe Asp Tyr Ser Arg Cys Pro Leu Thr

180

185

190

tct ggc ttt cct gtc ttc gtc tat gac agt gac cag ttt gcc ttt ggg 625

Ser Gly Phe Pro Val Phe Val Tyr Asp Ser Asp Gln Phe Ala Phe Gly

195

200

205

agc tac ctg gac cct ttg gtc aag cag gct ttt cag gct aca gtg aga 673

Ser Tyr Leu Asp Pro Leu Val Lys Gln Ala Phe Gln Ala Thr Val Arg

210

215

220

gcc aac gtt tat gtt aca gaa aat gca gcc atc gcc tgc ctg tat gtg 721

Ala Asn Val Tyr Val Thr Glu Asn Ala Ala Ile Ala Cys Leu Tyr Val

225

230

235

THIS PAGE BLANK (USPTO)

12/52

gtg tta gtg gga gag ata caa gag ccc gct gtg ctg cag cct gcc gac 769
Val Leu Val Gly Glu Ile Gln Glu Pro Ala Val Leu Gln Pro Ala Asp
240 245 250 255

ctt gag aag cag ctg cat tct ctg cca cac tgg agg aca gac gga cac 817
Leu Glu Lys Gln Leu His Ser Leu Pro His Trp Arg Thr Asp Gly His
260 265 270

aac cat gtc atc atc aat ctg tcc cgg aag tca gac aca caa aat tta 865
Asn His Val Ile Ile Asn Leu Ser Arg Lys Ser Asp Thr Gln Asn Leu
275 280 285

ctg tac aat gtc agt aca ggt cgg gcc atg gtg gcc cag tct acc ttc 913
Leu Tyr Asn Val Ser Thr Gly Arg Ala Met Val Ala Gln Ser Thr Phe
290 295 300

tat gct gcc cag tac aga gct ggc ttt gac ttg gtt gtg tca cca ctt 961
Tyr Ala Ala Gln Tyr Arg Ala Gly Phe Asp Leu Val Val Ser Pro Leu
305 310 315

gtc cat gcc atg tct gaa ccc aac ttc atg gaa atc cca ccg cag gtg 1009
Val His Ala Met Ser Glu Pro Asn Phe Met Glu Ile Pro Pro Gln Val
320 325 330 335

cca gtt aag cgg aaa tat ctc ttc act ttc cag ggt gag aag att gag 1057

THIS PAGE BLANK (USPTO)

13/52

Pro Val Lys Arg Lys Tyr Leu Phe Thr Phe Gln Gly Glu Lys Ile Glu

340

345

350

tct cta aga tct agc ctt cag gag gcc cgt tcc ttt gag gaa gaa atg 1105

Ser Leu Arg Ser Ser Leu Gln Glu Ala Arg Ser Phe Glu Glu Glu Met

355

360

365

gag ggt gac cct ccg gcc gac tat gat gat cga atc att gcc acc ctc 1153

Glu Gly Asp Pro Pro Ala Asp Tyr Asp Asp Arg Ile Ile Ala Thr Leu

370

375

380

aag gcc gta cag gac agc aag cta gat cag gtg ctg gta gaa ttt act 1201

Lys Ala Val Gln Asp Ser Lys Leu Asp Gln Val Leu Val Glu Phe Thr

385

390

395

tgc aaa aac cag cca aag ccc agt ctg cct act gag tgg gca ctg tgt 1249

Cys Lys Asn Gln Pro Lys Pro Ser Leu Pro Thr Glu Trp Ala Leu Cys

400

405

410

415

ggg gag cgg gag gac cgg cta gag tta ctg aag ctc tcc acc ttc gcc 1297

Gly Glu Arg Glu Asp Arg Leu Glu Leu Leu Lys Leu Ser Thr Phe Ala

420

425

430

ctc atc atc act ccc ggg gac ccg agc ctg ctt atc tca tct ggc tgt 1345

Leu Ile Ile Thr Pro Gly Asp Pro Ser Leu Leu Ile Ser Ser Gly Cys

435

440

445

THIS PAGE BLANK (USPTO)

14/52

gca aca cgg ctc ttt gaa gcc ttg gag gtg gga gct gtg cct gtt gtc 1393
Ala Thr Arg Leu Phe Glu Ala Leu Glu Val Gly Ala Val Pro Val Val
450 455 460

ctt ggg gag cag gtg cag ctt ccg tac cac gac atg cta caa tgg aat 1441
Leu Gly Glu Gln Val Gln Leu Pro Tyr His Asp Met Leu Gln Trp Asn
465 470 475

gag gcc gcc cta gtg gtg ccc aag cct cgt gtt aca gag gtt cac ttc 1489
Glu Ala Ala Leu Val Val Pro Lys Pro Arg Val Thr Glu Val His Phe
480 485 490 495

ctg tta cga agt ctg tca gac agt gat ctg ttg gct atg agg cgg caa 1537
Leu Leu Arg Ser Leu Ser Asp Ser Asp Leu Leu Ala Met Arg Arg Gln
500 505 510

ggc cgc ttt ctc tgg gag acc tac ttc tcc acc gct gac agt att ttt 1585
Gly Arg Phe Leu Trp Glu Thr Tyr Phe Ser Thr Ala Asp Ser Ile Phe
515 520 525

aat acc gtg ctg gcc atg att agg act cga att cag atc cca gct gct 1633
Asn Thr Val Leu Ala Met Ile Arg Thr Arg Ile Gln Ile Pro Ala Ala
530 535 540

ccc atc cgg gaa gag gta gca gct gag atc ccc cat cgt tca ggc aag 1681

THIS PAGE BLANK (USPTO)

15/52

Pro Ile Arg Glu Glu Val Ala Ala Glu Ile Pro His Arg Ser Gly Lys

545

550

555

gca gct ggt act gac ccc aac atg gct gac aat ggg gac ctg gac ctg 1729

Ala Ala Gly Thr Asp Pro Asn Met Ala Asp Asn Gly Asp Leu Asp Leu

560

565

570

575

ggg ccg gta gag aca gag ccg ccc tat gcc tca cct aaa tac ctc cgt 1777

Gly Pro Val Glu Thr Glu Pro Pro Tyr Ala Ser Pro Lys Tyr Leu Arg

580

585

590

aat ttc act ctg act gtc act gac tgt tac cgc agc tgg aac tcc gca 1825

Asn Phe Thr Leu Thr Val Thr Asp Cys Tyr Arg Ser Trp Asn Ser Ala

595

600

605

ccc gga cct ttc cat ctt ttt cca cac aca ccc ttt gac cct gtg ctg 1873

Pro Gly Pro Phe His Leu Phe Pro His Thr Pro Phe Asp Pro Val Leu

610

615

620

ccc tct gag gcc aaa ttc ctg ggc tca ggg act gga ttt cgg ccc atc 1921

Pro Ser Glu Ala Lys Phe Leu Gly Ser Gly Thr Gly Phe Arg Pro Ile

625

630

635

ggt ggt ggg gct ggg ggc tct ggc aag gag ttc cag gca gcg ctt gga 1969

Gly Gly Gly Ala Gly Gly Ser Gly Lys Glu Phe Gln Ala Ala Leu Gly

640

645

650

655

THIS PAGE BLANK (USPTO)

ggc aat gtc cag cgg gag cag ttc aca gtt gtg atg ctg acc tac gag 2017
Gly Asn Val Gln Arg Glu Gln Phe Thr Val Val Met Leu Thr Tyr Glu
660 665 670

cgg gag gaa gtg ctc atg aac tcc ctg gag agg ctc aat ggc ctc ccc 2065
Arg Glu Glu Val Leu Met Asn Ser Leu Glu Arg Leu Asn Gly Leu Pro
675 680 685

tac ctg aac aag gta gtg gtg gtg tgg aac tct ccc aag ctg ccc tcg 2113
Tyr Leu Asn Lys Val Val Val Val Trp Asn Ser Pro Lys Leu Pro Ser
690 695 700

gag gac ctt ttg tgg cca gac att ggt gtc ccc atc atg gtt gtc cgt 2161
Glu Asp Leu Leu Trp Pro Asp Ile Gly Val Pro Ile Met Val Val Arg
705 710 715

act gag aag aac agt ttg aac aat cgg ttc ttg ccc tgg aat gag ata 2209
Thr Glu Lys Asn Ser Leu Asn Asn Arg Phe Leu Pro Trp Asn Glu Ile
720 725 730 735

gag aca gag gca ata ttg tcc atc gat gac gat gcc cac ctc cgc cat 2257
Glu Thr Glu Ala Ile Leu Ser Ile Asp Asp Asp Ala His Leu Arg His
740 745 750

gat gaa atc atg ttc ggg ttt cgg gtg tgg aga gag gcg cgt gat cgc 2305

THIS PAGE BLANK (USPTO)

17/52

Asp Glu Ile Met Phe Gly Phe Arg Val Trp Arg Glu Ala Arg Asp Arg

755

760

765

att gtg ggg ttc cct ggc cgg tac cat gcg tgg gac atc cct cac cag 2353

Ile Val Gly Phe Pro Gly Arg Tyr His Ala Trp Asp Ile Pro His Gln

770

775

780

tcc tgg ctc tac aac tcc aac tac tcc tgt gag ctg tcc atg gtg ctg 2401

Ser Trp Leu Tyr Asn Ser Asn Tyr Ser Cys Glu Leu Ser Met Val Leu

785

790

795

acg ggt gct gcc ttc ttt cac aag tat tac gcc tac ctg tat tct tat 2449

Thr Gly Ala Ala Phe Phe His Lys Tyr Tyr Ala Tyr Leu Tyr Ser Tyr

800

805

810

815

gtg atg ccc cag gcc atc cga gac atg gtg gat gag tat atc aac tgt 2497

Val Met Pro Gln Ala Ile Arg Asp Met Val Asp Glu Tyr Ile Asn Cys

820

825

830

gag gat atc gcc atg aac ttc ctt gtc tcc cac atc aca cgg aag ccc 2545

Glu Asp Ile Ala Met Asn Phe Leu Val Ser His Ile Thr Arg Lys Pro

835

840

845

ccc atc aag gtg aca tcg agg tgg act ttt cga tgc ccg ggg tgc cct 2593

Pro Ile Lys Val Thr Ser Arg Trp Thr Phe Arg Cys Pro Gly Cys Pro

850

855

860

THIS PAGE BLANK (USPTO)

cag gcc ctg tcc cac gat gac tct cac ttt cat gag cgg cac aag tgt 2641
Gln Ala Leu Ser His Asp Asp Ser His Phe His Glu Arg His Lys Cys
865 870 875

atc aac ttt ttt gtc aag gtg tac ggc tat atg cct ctc ctg tac aca 2689
Ile Asn Phe Phe Val Lys Val Tyr Gly Tyr Met Pro Leu Leu Tyr Thr
880 885 890 895

cag ttt agg gtg gac tct gtg ctc ttc aag acc cgc ctg ccc cat gac 2737
Gln Phe Arg Val Asp Ser Val Leu Phe Lys Thr Arg Leu Pro His Asp
900 905 910

aag acc aag tgc ttc aag ttc atc tagggccttg ccagttctga ggagaagaca 2791
Lys Thr Lys Cys Phe Lys Phe Ile
915

gtgagcagag tgaggggagt caccccaag gttcccaagg tgttgaaggt ccttggggac 2851

atcgtgggca gggcccaggc cctttgcttg gagaagagca gggagagtag aaagggatgg 2911

ctgtctttat tttgaagtca gccgcactgg gcctggaatc ctggtcagca gactcagggc 2971

accgactaat ggccaacact gaggactgtt catgagcccg ggacagctgg ttcccggttt 3031

ttaaattcag aacagcattt actatttaaa gagagagttt cacatctgcc atccaaggct 3091

THIS PAGE BLANK (USPTO)

19/52

tatttatatg tgcgtatatg tacacacata tgtgtatata catgtatatg cacgcacaca 3151

cacacacaca cacacacaca cacacacaca cacacacagc ggcccgcg 3198

<210> 4

<211> 919

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 4

Met Thr Gly Tyr Thr Met Leu Arg Asn Gly Gly Val Gly Asn Gly Gly

1

5

10

15

Gln Thr Cys Met Leu Arg Trp Ser Asn Arg Ile Arg Leu Thr Trp Leu

20

25

30

Ser Phe Thr Leu Phe Ile Ile Leu Val Phe Phe Pro Leu Ile Ala His

35

40

45

Tyr Tyr Leu Thr Thr Leu Asp Glu Ala Asp Glu Ala Gly Lys Arg Ile

50

55

60

Phe Gly Pro Arg Ala Gly Asn Glu Leu Cys Glu Val Lys His Val Leu

65

70

75

80

THIS PAGE BLANK (USPTO)

20/52

Asp Leu Cys Arg Ile Arg Glu Ser Val Ser Glu Glu Leu Leu Gln Leu

85

90

95

Glu Ala Lys Arg Gln Glu Leu Asn Ser Glu Ile Ala Lys Leu Asn Leu

100

105

110

Lys Ile Glu Ala Cys Lys Lys Ser Ile Glu Asn Ala Lys Gln Asp Leu

115

120

125

Leu Gln Leu Lys Asn Val Ile Ser Gln Thr Glu His Ser Tyr Lys Glu

130

135

140

Leu Met Ala Gln Asn Gln Pro Lys Leu Ser Leu Pro Ile Arg Leu Leu

145

150

155

160

Pro Glu Lys Asp Asp Ala Gly Leu Pro Pro Pro Lys Val Thr Arg Gly

165

170

175

Cys Arg Leu His Asn Cys Phe Asp Tyr Ser Arg Cys Pro Leu Thr Ser

180

185

190

Gly Phe Pro Val Phe Val Tyr Asp Ser Asp Gln Phe Ala Phe Gly Ser

195

200

205

Tyr Leu Asp Pro Leu Val Lys Gln Ala Phe Gln Ala Thr Val Arg Ala

THIS PAGE BLANK (USPTO)

21/52

210	215	220
Asn Val Tyr Val Thr Glu Asn Ala Ala Ile Ala Cys Leu Tyr Val Val		
225	230	235 240
Leu Val Gly Glu Ile Gln Glu Pro Ala Val Leu Gln Pro Ala Asp Leu		
245	250	255
Glu Lys Gln Leu His Ser Leu Pro His Trp Arg Thr Asp Gly His Asn		
260	265	270
His Val Ile Ile Asn Leu Ser Arg Lys Ser Asp Thr Gln Asn Leu Leu		
275	280	285
Tyr Asn Val Ser Thr Gly Arg Ala Met Val Ala Gln Ser Thr Phe Tyr		
290	295	300
Ala Ala Gln Tyr Arg Ala Gly Phe Asp Leu Val Val Ser Pro Leu Val		
305	310	315 320
His Ala Met Ser Glu Pro Asn Phe Met Glu Ile Pro Pro Gln Val Pro		
325	330	335
Val Lys Arg Lys Tyr Leu Phe Thr Phe Gln Gly Glu Lys Ile Glu Ser		
340	345	350

THIS PAGE BLANK (USPTO)

22/52

Leu Arg Ser Ser Leu Gln Glu Ala Arg Ser Phe Glu Glu Glu Met Glu
355 360 365

Gly Asp Pro Pro Ala Asp Tyr Asp Asp Arg Ile Ile Ala Thr Leu Lys
370 375 380

Ala Val Gln Asp Ser Lys Leu Asp Gln Val Leu Val Glu Phe Thr Cys
385 390 395 400

Lys Asn Gln Pro Lys Pro Ser Leu Pro Thr Glu Trp Ala Leu Cys Gly
405 410 415

Glu Arg Glu Asp Arg Leu Glu Leu Leu Lys Leu Ser Thr Phe Ala Leu
420 425 430

Ile Ile Thr Pro Gly Asp Pro Ser Leu Leu Ile Ser Ser Gly Cys Ala
435 440 445

Thr Arg Leu Phe Glu Ala Leu Glu Val Gly Ala Val Pro Val Val Leu
450 455 460

Gly Glu Gln Val Gln Leu Pro Tyr His Asp Met Leu Gln Trp Asn Glu
465 470 475 480

Ala Ala Leu Val Val Pro Lys Pro Arg Val Thr Glu Val His Phe Leu
485 490 495

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Leu Arg Ser Leu Ser Asp Ser Asp Leu Leu Ala Met Arg Arg Gln Gly

500

505

510

Arg Phe Leu Trp Glu Thr Tyr Phe Ser Thr Ala Asp Ser Ile Phe Asn

515

520

525

Thr Val Leu Ala Met Ile Arg Thr Arg Ile Gln Ile Pro Ala Ala Pro

530

535

540

Ile Arg Glu Glu Val Ala Ala Glu Ile Pro His Arg Ser Gly Lys Ala

545

550

555

560

Ala Gly Thr Asp Pro Asn Met Ala Asp Asn Gly Asp Leu Asp Leu Gly

565

570

575

Pro Val Glu Thr Glu Pro Pro Tyr Ala Ser Pro Lys Tyr Leu Arg Asn

580

585

590

Phe Thr Leu Thr Val Thr Asp Cys Tyr Arg Ser Trp Asn Ser Ala Pro

595

600

605

Gly Pro Phe His Leu Phe Pro His Thr Pro Phe Asp Pro Val Leu Pro

610

615

620

Ser Glu Ala Lys Phe Leu Gly Ser Gly Thr Gly Phe Arg Pro Ile Gly

THIS PAGE BLANK (USPTO)

24/52

625	630	635	640
Gly Gly Ala Gly Gly Ser Gly Lys Glu Phe Gln Ala Ala Leu Gly Gly			
645	650	655	
Asn Val Gln Arg Glu Gln Phe Thr Val Val Met Leu Thr Tyr Glu Arg			
660	665	670	
Glu Glu Val Leu Met Asn Ser Leu Glu Arg Leu Asn Gly Leu Pro Tyr			
675	680	685	
Leu Asn Lys Val Val Val Val Trp Asn Ser Pro Lys Leu Pro Ser Glu			
690	695	700	
Asp Leu Leu Trp Pro Asp Ile Gly Val Pro Ile Met Val Val Arg Thr			
705	710	715	720
Glu Lys Asn Ser Leu Asn Asn Arg Phe Leu Pro Trp Asn Glu Ile Glu			
725	730	735	
Thr Glu Ala Ile Leu Ser Ile Asp Asp Asp Ala His Leu Arg His Asp			
740	745	750	
Glu Ile Met Phe Gly Phe Arg Val Trp Arg Glu Ala Arg Asp Arg Ile			
755	760	765	

THIS PAGE BLANK (USPTO)

25/52

Val Gly Phe Pro Gly Arg Tyr His Ala Trp Asp Ile Pro His Gln Ser
770 775 780

Trp Leu Tyr Asn Ser Asn Tyr Ser Cys Glu Leu Ser Met Val Leu Thr
785 790 795 800

Gly Ala Ala Phe Phe His Lys Tyr Tyr Ala Tyr Leu Tyr Ser Tyr Val
805 810 815

Met Pro Gln Ala Ile Arg Asp Met Val Asp Glu Tyr Ile Asn Cys Glu
820 825 830

Asp Ile Ala Met Asn Phe Leu Val Ser His Ile Thr Arg Lys Pro Pro
835 840 845

Ile Lys Val Thr Ser Arg Trp Thr Phe Arg Cys Pro Gly Cys Pro Gln
850 855 860

Ala Leu Ser His Asp Asp Ser His Phe His Glu Arg His Lys Cys Ile
865 870 875 880

Asn Phe Phe Val Lys Val Tyr Gly Tyr Met Pro Leu Leu Tyr Thr Gln
885 890 895

Phe Arg Val Asp Ser Val Leu Phe Lys Thr Arg Leu Pro His Asp Lys
900 905 910

THIS PAGE BLANK (USPTO)

26/52

Thr Lys Cys Phe Lys Phe Ile

915

<210> 5

<211> 919

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Met Thr Gly Tyr Thr Met Leu Arg Asn Gly Gly Ala Gly Asn Gly Gly

1

5

10

15

Gln Thr Cys Met Leu Arg Trp Ser Asn Arg Ile Arg Leu Thr Trp Leu

20

25

30

Ser Phe Thr Leu Phe Val Ile Leu Val Phe Phe Pro Leu Ile Ala His

35

40

45

Tyr Tyr Leu Thr Thr Leu Asp Glu Ala Asp Glu Ala Gly Lys Arg Ile

50

55

60

Phe Gly Pro Arg Val Gly Asn Glu Leu Cys Glu Val Lys His Val Leu

65

70

75

80

THIS PAGE BLANK (USPTO)

27/52

Asp Leu Cys Arg Ile Arg Glu Ser Val Ser Glu Glu Leu Leu Gln Leu

85

90

95

Glu Ala Lys Arg Gln Glu Leu Asn Ser Glu Ile Ala Lys Leu Asn Leu

100

105

110

Lys Ile Glu Ala Cys Lys Lys Ser Ile Glu Asn Ala Lys Gln Asp Leu

115

120

125

Leu Gln Leu Lys Asn Val Ile Ser Gln Thr Glu His Ser Tyr Lys Glu

130

135

140

Leu Met Ala Gln Asn Gln Pro Lys Leu Ser Leu Pro Ile Arg Leu Leu

145

150

155

160

Pro Glu Lys Asp Asp Ala Gly Leu Pro Pro Pro Lys Ala Thr Arg Gly

165

170

175

Cys Arg Leu His Asn Cys Phe Asp Tyr Ser Arg Cys Pro Leu Thr Ser

180

185

190

Gly Phe Pro Val Tyr Val Tyr Asp Ser Asp Gln Phe Val Phe Gly Ser

195

200

205

Tyr Leu Asp Pro Leu Val Lys Gln Ala Phe Gln Ala Thr Ala Arg Ala

210

215

220

THIS PAGE BLANK (USPTO)

28/52

Asn Val Tyr Val Thr Glu Asn Ala Asp Ile Ala Cys Leu Tyr Val Ile

225 230 235 240

Leu Val Gly Glu Met Gln Glu Pro Val Val Leu Arg Pro Ala Glu Leu

245 250 255

Glu Lys Gln Leu Tyr Ser Leu Pro His Trp Arg Thr Asp Gly His Asn

260 265 270

His Val Ile Ile Asn Leu Ser Arg Lys Ser Asp Thr Gln Asn Leu Leu

275 280 285

Tyr Asn Val Ser Thr Gly Arg Ala Met Val Ala Gln Ser Thr Phe Tyr

290 295 300

Thr Val Gln Tyr Arg Pro Gly Phe Asp Leu Val Val Ser Pro Leu Val

305 310 315 320

His Ala Met Ser Glu Pro Asn Phe Met Glu Ile Pro Pro Gln Val Pro

325 330 335

Val Lys Arg Lys Tyr Leu Phe Thr Phe Gln Gly Glu Lys Ile Glu Ser

340 345 350

Leu Arg Ser Ser Leu Gln Glu Ala Arg Ser Phe Glu Glu Glu Met Glu

THIS PAGE BLANK (USPTO)

29/52

355	360	365
Gly Asp Pro Pro Ala Asp Tyr Asp Asp Arg Ile Ile Ala Thr Leu Lys		
370	375	380
Ala Val Gln Asp Ser Lys Leu Asp Gln Val Leu Val Glu Phe Thr Cys		
385	390	395
		400
Lys Asn Gln Pro Lys Pro Ser Leu Pro Thr Glu Trp Ala Leu Cys Gly		
	405	410
		415
Glu Arg Glu Asp Arg Leu Glu Leu Leu Lys Leu Ser Thr Phe Ala Leu		
	420	425
		430
Ile Ile Thr Pro Gly Asp Pro Arg Leu Val Ile Ser Ser Gly Cys Ala		
	435	440
		445
Thr Arg Leu Phe Glu Ala Leu Glu Val Gly Ala Val Pro Val Val Leu		
	450	455
		460
Gly Glu Gln Val Gln Leu Pro Tyr Gln Asp Met Leu Gln Trp Asn Glu		
465	470	475
		480
Ala Ala Leu Val Val Pro Lys Pro Arg Val Thr Glu Val His Phe Leu		
	485	490
		495

THIS PAGE BLANK (USPTO)

30/52

Leu Arg Ser Leu Ser Asp Ser Asp Leu Leu Ala Met Arg Arg Gln Gly

500

505

510

Arg Phe Leu Trp Glu Thr Tyr Phe Ser Thr Ala Asp Ser Ile Phe Asn

515

520

525

Thr Val Leu Ala Met Ile Arg Thr Arg Ile Gln Ile Pro Ala Ala Pro

530

535

540

Ile Arg Glu Glu Ala Ala Ala Glu Ile Pro His Arg Ser Gly Lys Ala

545

550

555

560

Ala Gly Thr Asp Pro Asn Met Ala Asp Asn Gly Asp Leu Asp Leu Gly

565

570

575

Pro Val Glu Thr Glu Pro Pro Tyr Ala Ser Pro Arg Tyr Leu Arg Asn

580

585

590

Phe Thr Leu Thr Val Thr Asp Phe Tyr Arg Ser Trp Asn Cys Ala Pro

595

600

605

Gly Pro Phe His Leu Phe Pro His Thr Pro Phe Asp Pro Val Leu Pro

610

615

620

Ser Glu Ala Lys Phe Leu Gly Ser Gly Thr Gly Phe Arg Pro Ile Gly

625

630

635

640

THIS PAGE BLANK (USPTO)

31/52

Gly Gly Ala Gly Gly Ser Gly Lys Glu Phe Gln Ala Ala Leu Gly Gly

645

650

655

Asn Val Pro Arg Glu Gln Phe Thr Val Val Met Leu Thr Tyr Glu Arg

660

665

670

Glu Glu Val Leu Met Asn Ser Leu Glu Arg Leu Asn Gly Leu Pro Tyr

675

680

685

Leu Asn Lys Val Val Val Val Trp Asn Ser Pro Lys Leu Pro Ser Glu

690

695

700

Asp Leu Leu Trp Pro Asp Ile Gly Val Pro Ile Met Val Val Arg Thr

705

710

715

720

Glu Lys Asn Ser Leu Asn Asn Arg Phe Leu Pro Trp Asn Glu Ile Glu

725

730

735

Thr Glu Ala Ile Leu Ser Ile Asp Asp Asp Ala His Leu Arg His Asp

740

745

750

Glu Ile Met Phe Gly Phe Arg Val Trp Arg Glu Ala Arg Asp Arg Ile

755

760

765

Val Gly Phe Pro Gly Arg Tyr His Ala Trp Asp Ile Pro His Gln Ser

THIS PAGE BLANK (USPTO)

32/52

770	775	780	
Trp Leu Tyr Asn Ser Asn Tyr Ser Cys Glu Leu Ser Met Val Leu Thr			
785	790	795	800
Gly Ala Ala Phe Phe His Lys Tyr Tyr Ala Tyr Leu Tyr Ser Tyr Val			
	805	810	815
Met Pro Gln Ala Ile Arg Asp Met Val Asp Glu Tyr Ile Asn Cys Glu			
	820	825	830
Asp Ile Ala Met Asn Phe Leu Val Ser His Ile Thr Arg Lys Pro Pro			
	835	840	845
Ile Lys Val Thr Ser Arg Trp Thr Phe Arg Cys Pro Gly Cys Pro Gln			
	850	855	860
Ala Leu Ser His Asp Asp Ser His Phe His Glu Arg His Lys Cys Ile			
865	870	875	880
Asn Phe Phe Val Lys Val Tyr Gly Tyr Met Pro Leu Leu Tyr Thr Gln			
	885	890	895
Phe Arg Val Asp Ser Val Leu Phe Lys Thr Arg Leu Pro His Asp Lys			
	900	905	910

THIS PAGE BLANK (USPTO)

33/52

Thr Lys Cys Phe Lys Phe Ile

915

<210> 6

<211> 718

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Met Cys Ala Ser Val Lys Tyr Asn Ile Arg Gly Pro Ala Leu Ile Pro

1

5

10

15

Arg Met Lys Thr Lys His Arg Ile Tyr Tyr Ile Thr Leu Phe Ser Ile

20

25

30

Val Leu Leu Gly Leu Ile Ala Thr Gly Met Phe Gln Phe Trp Pro His

35

40

45

Ser Ile Glu Ser Ser Asn Asp Trp Asn Val Glu Lys Arg Ser Ile Arg

50

55

60

Asp Val Pro Val Val Arg Leu Pro Ala Asp Ser Pro Ile Pro Glu Arg

65

70

75

80

Gly Asp Leu Ser Cys Arg Met His Thr Cys Phe Asp Val Tyr Arg Cys

THIS PAGE BLANK (USPTO)

34/52

	85	90	95
Gly Phe Asn Pro Lys Asn Lys Ile Lys Val Tyr Ile Tyr Ala Leu Lys			
	100	105	110
Lys Tyr Val Asp Asp Phe Gly Val Ser Val Ser Asn Thr Ile Ser Arg			
	115	120	125
Glu Tyr Asn Glu Leu Leu Met Ala Ile Ser Asp Ser Asp Tyr Tyr Thr			
	130	135	140
Asp Asp Ile Asn Arg Ala Cys Leu Phe Val Pro Ser Ile Asp Val Leu			
	145	150	155
			160
Asn Gln Asn Thr Leu Arg Ile Lys Glu Thr Ala Gln Ala Met Ala Gln			
	165	170	175
Leu Ser Arg Trp Asp Arg Gly Thr Asn His Leu Leu Phe Asn Met Leu			
	180	185	190
Pro Gly Gly Pro Pro Asp Tyr Asn Thr Ala Leu Asp Val Pro Arg Asp			
	195	200	205
Arg Ala Leu Leu Ala Gly Gly Gly Phe Ser Thr Trp Thr Tyr Arg Gln			
	210	215	220

THIS PAGE BLANK (USPTO)

35/52

Gly Tyr Asp Val Ser Ile Pro Val Tyr Ser Pro Leu Ser Ala Glu Val
225 230 235 240

Asp Leu Pro Glu Lys Gly Pro Gly Pro Arg Gln Tyr Phe Leu Leu Ser
245 250 255

Ser Gln Val Gly Leu His Pro Glu Tyr Arg Glu Asp Leu Glu Ala Leu
260 265 270

Gln Val Lys His Gly Glu Ser Val Leu Val Leu Asp Lys Cys Thr Asn
275 280 285

Leu Ser Glu Gly Val Leu Ser Val Arg Lys Arg Cys His Lys His Gln
290 295 300

Val Phe Asp Tyr Pro Gln Val Leu Gln Glu Ala Thr Phe Cys Val Val
305 310 315 320

Leu Arg Gly Ala Arg Leu Gly Gln Ala Val Leu Ser Asp Val Leu Gln
325 330 335

Ala Gly Cys Val Pro Val Val Ile Ala Asp Ser Tyr Ile Leu Pro Phe
340 345 350

Ser Glu Val Leu Asp Trp Lys Arg Ala Ser Val Val Val Pro Glu Glu
355 360 365

THIS PAGE BLANK (USPTO)

36/52

Lys Met Ser Asp Val Tyr Ser Ile Leu Gln Ser Ile Pro Gln Arg Gln

370

375

380

Ile Glu Glu Met Gln Arg Gln Ala Arg Trp Phe Trp Glu Ala Tyr Phe

385

390

395

400

Gln Ser Ile Lys Ala Ile Ala Leu Ala Thr Leu Gln Ile Ile Asn Asp

405

410

415

Arg Ile Tyr Pro Tyr Ala Ala Ile Ser Tyr Glu Glu Trp Asn Asp Pro

420

425

430

Pro Ala Val Lys Trp Gly Ser Val Ser Asn Pro Leu Phe Leu Pro Leu

435

440

445

Ile Pro Pro Gln Ser Gln Gly Phe Thr Ala Ile Val Leu Thr Tyr Asp

450

455

460

Arg Val Glu Ser Leu Phe Arg Val Ile Thr Glu Val Ser Lys Val Pro

465

470

475

480

Ser Leu Ser Lys Leu Leu Val Val Trp Asn Asn Gln Asn Lys Asn Pro

485

490

495

Pro Glu Asp Ser Leu Trp Pro Lys Ile Arg Val Pro Leu Lys Val Val

THIS PAGE BLANK (USPTO)

37/52

500	505	510
Arg Thr Ala Glu Asn Lys Leu Ser Asn Arg Phe Phe Pro Tyr Asp Glu		
515	520	525
Ile Glu Thr Glu Ala Val Leu Ala Ile Asp Asp Asp Ile Ile Met Leu		
530	535	540
Thr Ser Asp Glu Leu Gln Phe Gly Tyr Glu Val Trp Arg Glu Phe Pro		
545	550	555 560
Asp Arg Leu Val Gly Tyr Pro Gly Arg Leu His Leu Trp Asp His Glu		
565	570	575
Met Asn Lys Trp Lys Tyr Glu Ser Glu Trp Thr Asn Glu Val Ser Met		
580	585	590
Val Leu Thr Gly Ala Ala Phe Tyr His Lys Tyr Phe Asn Tyr Leu Tyr		
595	600	605
Thr Tyr Lys Met Pro Gly Asp Ile Lys Asn Trp Val Asp Ala His Met		
610	615	620
Asn Cys Glu Asp Ile Ala Met Asn Phe Leu Val Ala Asn Val Thr Gly		
625	630	635 640

THIS PAGE BLANK (USPTO)

38/52

Lys Ala Val Ile Lys Val Thr Pro Arg Lys Lys Phe Lys Cys Pro Glu

645

650

655

Cys Thr Ala Ile Asp Gly Leu Ser Leu Asp Gln Thr His Met Val Glu

660

665

670

Arg Ser Glu Cys Ile Asn Lys Phe Ala Ser Val Phe Gly Thr Met Pro

675

680

685

Leu Lys Val Val Glu His Arg Ala Asp Pro Val Leu Tyr Lys Asp Asp

690

695

700

Phe Pro Glu Lys Leu Lys Ser Phe Pro Asn Ile Gly Ser Leu

705

710

715

<210> 7

<211> 746

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Met Gln Ala Lys Lys Arg Tyr Phe Ile Leu Leu Ser Ala Gly Ser Cys

1

5

10

15

Leu Ala Leu Leu Phe Tyr Phe Gly Gly Leu Gln Phe Arg Ala Ser Arg

THIS PAGE BLANK (USPTO)

39/52

	20		25		30
Ser His Ser Arg Arg Glu Glu His Ser Gly Arg Asn Gly Leu His His					
35		40		45	
Pro Ser Pro Asp His Phe Trp Pro Arg Phe Pro Glu Pro Leu Arg Pro					
50		55		60	
Phe Val Pro Trp Asp Gln Leu Glu Asn Glu Asp Ser Ser Val His Ile					
65		70		75	80
Ser Pro Arg Gln Lys Arg Asp Ala Asn Ser Ser Ile Tyr Lys Gly Lys					
	85		90		95
Lys Cys Arg Met Glu Ser Cys Phe Asp Phe Thr Leu Cys Lys Lys Asn					
100		105		110	
Gly Phe Lys Val Tyr Val Tyr Pro Gln Gln Lys Gly Glu Lys Ile Ala					
115		120		125	
Glu Ser Tyr Gln Asn Ile Leu Ala Ala Ile Glu Gly Ser Arg Phe Tyr					
130		135		140	
Thr Ser Asp Pro Ser Gln Ala Cys Leu Phe Val Leu Ser Leu Asp Thr					
145		150		155	160

THIS PAGE BLANK (USPTO)

40/52

Leu Asp Arg Asp Gln Leu Ser Pro Gln Tyr Val His Asn Leu Arg Ser

165

170

175

Lys Val Gln Ser Leu His Leu Trp Asn Asn Gly Arg Asn His Leu Ile

180

185

190

Phe Asn Leu Tyr Ser Gly Thr Trp Pro Asp Tyr Thr Glu Asp Val Gly

195

200

205

Phe Asp Ile Gly Gln Ala Met Leu Ala Lys Ala Ser Ile Ser Thr Glu

210

215

220

Asn Phe Arg Pro Asn Phe Asp Val Ser Ile Pro Leu Phe Ser Lys Asp

225

230

235

240

His Pro Arg Thr Gly Gly Glu Arg Gly Phe Leu Lys Phe Asn Thr Ile

245

250

255

Pro Pro Leu Arg Lys Tyr Met Leu Val Phe Lys Gly Lys Arg Tyr Leu

260

265

270

Thr Gly Ile Gly Ser Asp Thr Arg Asn Ala Leu Tyr His Val His Asn

275

280

285

Gly Glu Asp Val Val Leu Leu Thr Thr Cys Lys His Gly Lys Asp Trp

290

295

300

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Gln Lys His Lys Asp Ser Arg Cys Asp Arg Asp Asn Thr Glu Tyr Glu
305 310 315 320

Lys Tyr Asp Tyr Arg Glu Met Leu His Asn Ala Thr Phe Cys Leu Val
325 330 335

Pro Arg Gly Arg Arg Leu Gly Ser Phe Arg Phe Leu Glu Ala Leu Gln
340 345 350

Ala Ala Cys Val Pro Val Met Leu Ser Asn Gly Trp Glu Leu Pro Phe
355 360 365

Ser Glu Val Ile Asn Trp Asn Gln Ala Ala Val Ile Gly Asp Glu Arg
370 375 380

Leu Leu Leu Gln Ile Pro Ser Thr Ile Arg Ser Ile His Gln Asp Lys
385 390 395 400

Ile Leu Ala Leu Arg Gln Gln Thr Gln Phe Leu Trp Glu Ala Tyr Phe
405 410 415

Ser Ser Val Glu Lys Ile Val Leu Thr Thr Leu Glu Ile Ile Gln Asp
420 425 430

Arg Ile Phe Lys His Ile Ser Arg Asn Ser Leu Ile Trp Asn Lys His

THIS PAGE BLANK (USPTO)

42/52

435	440	445
Pro Gly Gly Leu Phe Val Leu Pro Gln Tyr Ser Ser Tyr Leu Gly Asp		
450	455	460
Phe Pro Tyr Tyr Tyr Ala Asn Leu Gly Leu Lys Pro Pro Ser Lys Phe		
465	470	475
		480
Thr Ala Val Ile His Ala Val Thr Pro Leu Val Ser Gln Ser Gln Pro		
	485	490
		495
Val Leu Lys Leu Leu Val Ala Ala Ala Lys Ser Gln Tyr Cys Ala Gln		
500	505	510
Ile Ile Val Leu Trp Asn Cys Asp Lys Pro Leu Pro Ala Lys His Arg		
515	520	525
Trp Pro Ala Thr Ala Val Pro Val Val Val Ile Glu Gly Glu Ser Lys		
530	535	540
Val Met Ser Ser Arg Phe Leu Pro Tyr Asp Asn Ile Ile Thr Asp Ala		
545	550	555
		560
Val Leu Ser Leu Asp Glu Asp Thr Val Leu Ser Thr Thr Glu Val Asp		
	565	570
		575

THIS PAGE BLANK (USPTO)

43/52

Phe Ala Phe Thr Val Trp Gln Ser Phe Pro Glu Arg Ile Val Gly Tyr

580

585

590

Pro Ala Arg Ser His Phe Trp Asp Asn Ser Lys Glu Arg Trp Gly Tyr

595

600

605

Thr Ser Lys Trp Thr Asn Asp Tyr Ser Met Val Leu Thr Gly Ala Ala

610

615

620

Ile Tyr His Lys Tyr Tyr His Tyr Leu Tyr Ser His Tyr Leu Pro Ala

625

630

635

640

Ser Leu Lys Asn Met Val Asp Gln Leu Ala Asn Cys Glu Asp Ile Leu

645

650

655

Met Asn Phe Leu Val Ser Ala Val Thr Lys Leu Pro Pro Ile Lys Val

660

665

670

Thr Gln Lys Lys Gln Tyr Lys Glu Thr Met Met Gly Gln Thr Ser Arg

675

680

685

Ala Ser Arg Trp Ala Asp Pro Asp His Phe Ala Gln Arg Gln Ser Cys

690

695

700

Met Asn Thr Phe Ala Ser Trp Phe Gly Tyr Met Pro Leu Ile His Ser

705

710

715

720

THIS PAGE BLANK (USPTO)

44/52

Gln Met Arg Leu Asp Pro Val Leu Phe Lys Asp Gln Val Ser Ile Leu

725

730

735

Arg Lys Lys Tyr Arg Asp Ile Glu Arg Leu

740

745

<210> 8

<211> 676

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Met Gln Ser Trp Arg Arg Arg Lys Ser Leu Trp Leu Ala Leu Ser Ala

1

5

10

15

Ser Trp Leu Leu Leu Val Leu Leu Gly Gly Phe Ser Leu Leu Arg Leu

20

25

30

Ala Leu Pro Pro Arg Pro Arg Pro Gly Ala Ser Gln Gly Trp Pro Arg

35

40

45

Trp Leu Asp Ala Glu Leu Leu Gln Ser Phe Ser Gln Pro Gly Glu Leu

50

55

60

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Pro Glu Asp Ala Val Ser Pro Pro Gln Ala Pro His Gly Gly Ser Cys
65 70 75 80

Asn Trp Glu Ser Cys Phe Asp Thr Ser Lys Cys Arg Gly Asp Gly Leu
85 90 95

Lys Val Phe Val Tyr Pro Ala Val Gly Thr Ile Ser Glu Thr His Arg
100 105 110

Arg Ile Leu Ala Ser Ile Glu Gly Ser Arg Phe Tyr Thr Phe Ser Pro
115 120 125

Ala Gly Ala Cys Leu Leu Leu Leu Leu Ser Leu Asp Ala Gln Thr Gly
130 135 140

Glu Cys Ser Ser Met Pro Leu Gln Trp Asn Arg Gly Arg Asn His Leu
145 150 155 160

Val Leu Arg Leu His Pro Ala Pro Cys Pro Arg Thr Phe Gln Leu Gly
165 170 175

Gln Ala Met Val Ala Glu Ala Ser Pro Thr Val Asp Ser Phe Arg Pro
180 185 190

Gly Phe Asp Val Ala Leu Pro Phe Leu Pro Glu Ala His Pro Leu Arg
195 200 205

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Gly Gly Ala Pro Gly Gln Leu Arg Gln His Ser Pro Gln Pro Gly Val

210

215

220

Ala Leu Leu Ala Leu Glu Glu Glu Arg Gly Gly Trp Arg Thr Ala Asp

225

230

235

240

Thr Gly Ser Ser Ala Cys Pro Trp Asp Gly Arg Cys Glu Gln Asp Pro

245

250

255

Gly Pro Gly Gln Thr Gln Arg Gln Glu Thr Leu Pro Asn Ala Thr Phe

260

265

270

Cys Leu Ile Ser Gly His Arg Pro Glu Ala Ala Ser Arg Phe Leu Gln

275

280

285

Ala Leu Gln Ala Gly Cys Ile Pro Val Leu Leu Ser Pro Arg Trp Glu

290

295

300

Leu Pro Phe Ser Glu Val Ile Asp Trp Thr Lys Ala Ala Ile Val Ala

305

310

315

320

Asp Glu Arg Leu Pro Leu Gln Val Leu Ala Ala Leu Gln Glu Met Ser

325

330

335

Pro Ala Arg Val Leu Ala Leu Arg Gln Gln Thr Gln Phe Leu Trp Asp

THIS PAGE BLANK (USPTO)

47/52

340	345	350
Ala Tyr Phe Ser Ser Val Glu Lys Val Ile His Thr Thr Leu Glu Val		
355	360	365
Ile Gln Asp Arg Ile Phe Gly Thr Ser Ala Asn Pro Ser Leu Leu Trp		
370	375	380
Asn Ser Pro Pro Gly Ala Leu Leu Ala Leu Ser Thr Phe Ser Thr Ser		
385	390	395 400
Pro Gln Asp Phe Pro Phe Tyr Tyr Leu Gln Gln Gly Ser Arg Pro Glu		
405	410	415
Gly Arg Phe Ser Ala Leu Ile Trp Val Gly Pro Pro Gly Gln Pro Pro		
420	425	430
Leu Lys Leu Ile Gln Ala Val Ala Gly Ser Gln His Cys Ala Gln Ile		
435	440	445
Leu Val Leu Trp Ser Asn Glu Arg Pro Leu Pro Ser Arg Trp Pro Glu		
450	455	460
Thr Ala Val Pro Leu Thr Val Ile Asp Gly His Arg Lys Val Ser Asp		
465	470	475 480

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Arg Phe Tyr Pro Tyr Ser Thr Ile Arg Thr Asp Ala Ile Leu Ser Leu

485

490

495

Asp Ala Arg Ser Ser Leu Ser Thr Ser Glu Val Asp Phe Ala Phe Leu

500

505

510

Val Trp Gln Ser Phe Pro Glu Arg Met Val Gly Phe Leu Thr Ser Ser

515

520

525

His Phe Trp Asp Glu Ala His Gly Gly Trp Gly Tyr Thr Ala Glu Arg

530

535

540

Thr Asn Glu Phe Ser Met Val Leu Thr Thr Ala Ala Phe Tyr His Arg

545

550

555

560

Tyr Tyr His Thr Leu Phe Thr His Ser Leu Pro Lys Ala Leu Arg Thr

565

570

575

Leu Ala Asp Glu Ala Pro Thr Cys Val Asp Val Leu Met Asn Phe Ile

580

585

590

Val Ala Ala Val Thr Lys Leu Pro Pro Ile Lys Val Pro Tyr Gly Lys

595

600

605

Gln Arg Gln Glu Ala Ala Pro Leu Ala Pro Gly Gly Pro Gly Pro Arg

610

615

620

THIS PAGE BLANK (USPTO)

49/52

Pro Lys Pro Pro Ala Pro Ala Pro Asp Cys Ile Asn Gln Ile Ala Ala
625 630 635 640

Ala Phe Gly His Met Pro Leu Leu Ser Ser Arg Leu Arg Leu Asp Pro
645 650 655

Val Leu Phe Lys Asp Pro Val Ser Val Gln Arg Lys Lys Tyr Arg Ser
660 665 670

Leu Glu Lys Pro
675

<210> 9

<211> 330

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Met Arg Cys Cys His Ile Cys Lys Leu Pro Gly Arg Val Met Gly Ile
1 5 10 15

Arg Val Leu Arg Leu Ser Leu Val Val Ile Leu Val Leu Leu Val
20 25 30

THIS PAGE BLANK (USPTO)

50/52

Ala Gly Ala Leu Thr Ala Leu Leu Pro Ser Val Lys Glu Asp Lys Met

35

40

45

Leu Met Leu Arg Arg Glu Ile Lys Ser Gln Gly Lys Ser Thr Met Asp

50

55

60

Ser Phe Thr Leu Ile Met Gln Thr Tyr Asn Arg Thr Asp Leu Leu Leu

65

70

75

80

Lys Leu Leu Asn His Tyr Gln Ala Val Pro Asn Leu His Lys Val Ile

85

90

95

Val Val Trp Asn Asn Ile Gly Glu Lys Ala Pro Asp Glu Leu Trp Asn

100

105

110

Ser Leu Gly Pro His Pro Ile Pro Val Ile Phe Lys Gln Gln Thr Ala

115

120

125

Asn Arg Met Arg Asn Arg Leu Gln Val Phe Pro Glu Leu Glu Thr Asn

130

135

140

Ala Val Leu Met Val Asp Asp Asp Thr Leu Ile Ser Thr Pro Asp Leu

145

150

155

160

Val Phe Ala Phe Ser Val Trp Gln Gln Phe Pro Asp Gln Ile Val Gly

165

170

175

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Phe Val Pro Arg Lys His Val Ser Thr Ser Ser Gly Ile Tyr Ser Tyr

180

185

190

Gly Ser Phe Glu Met Gln Ala Pro Gly Ser Gly Asn Gly Asp Gln Tyr

195

200

205

Ser Met Val Leu Ile Gly Ala Ser Phe Phe Asn Ser Lys Tyr Leu Glu

210

215

220

Leu Phe Gln Arg Gln Pro Ala Ala Val His Ala Leu Ile Asp Asp Thr

225

230

235

240

Gln Asn Cys Asp Asp Ile Ala Met Asn Phe Ile Ile Ala Lys His Ile

245

250

255

Gly Lys Thr Ser Gly Ile Phe Val Lys Pro Val Asn Met Asp Asn Leu

260

265

270

Glu Lys Glu Thr Asn Ser Gly Tyr Ser Gly Met Trp His Arg Ala Glu

275

280

285

His Ala Leu Gln Arg Ser Tyr Cys Ile Asn Lys Leu Val Asn Ile Tyr

290

295

300

Asp Ser Met Pro Leu Arg Tyr Ser Asn Ile Met Ile Ser Gln Phe Gly

THIS PAGE BLANK (USPTO)

52/52

305

310

315

320

Phe Pro Tyr Ala Asn Tyr Lys Arg Lys Ile

325

330

THIS PAGE BLANK (USPTO)

不利にならない開示又は新規
性喪失の例外に関する陳述

(23) Statement concerning non-prejudicial disclosure or exception to lack of novelty.

(1) 開示の日 14. 04. 00
開示の種類 刊行物発表
Publication
刊行物の名称 The Journal of Biological
Chemistry, Vol. 275, No. 15, 10723-10726

(2) 開示の日 14. 04. 00
開示の種類 電子的技術情報
Electronic Technical
Information
情報の名称 The Journal of Biological
Chemistry

1. Date of Disclosure: 30 October 1998

Embodiment of Disclosure: Disclosure on Publications

Proceedings of the Japanese Society for Immunology
Vol.28, 1998

2. Date of Disclosure: 18 June 1999

Embodiment of Disclosure: Disclosure on Publications

Human Immunology

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/03764

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N 15/09, C07K 14/435, C07K 16/18, C12N 1/15, C12N 1/21,
C12N 5/10, C12P 21/02, G01N 33/15, G01N 33/50, G01N 33/566,
A61K 31/00, A61K 38/00, A61K 45/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N 15/09, C07K 14/435, C07K 16/18, C12N 1/15, C12N 1/21,
C12N 5/10, C12P 21/02, G01N 33/15, G01N 33/50, G01N 33/566,
A61K 31/00, A61K 38/00, A61K 45/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DBJ/GeneSeq,
WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/A	Toshiyuki Saito et al., "Structure, chromosomal location, and expression profile of EXTR1 and EXTR2, new members of the multiple exostoses gene family", Biochemical and Biophysical Research Communications(1998), Vol.243, No.1, p.61-66	1-8,14/ 9-13,15,16
X/A	Wim Van Hul et al., "Identification of a third EXT-like gene (EXTL3) belonging to the EXT gene family", Genomics(1998), Vol.47, No.2, p.230-237	1-8,14/ 9-13,15,16
PX	Seiichi Kobayashi et al., "Identification of a receptor for Reg (Regenerating Gene) protein, a pancreatic β -Cell regeneration factor", The Journal of Biological Chemistry (April 14,2000), Vol.275, No.15, p.10723-10726	1-16

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
08 September, 2000 (08.09.00)

Date of mailing of the international search report
19 September, 2000 (19.09.00)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl' C12N 15/09, C07K 14/435, C07K 16/18, C12N 1/15, C12N 1/21,
C12N 5/10, C12P 21/02, G01N 33/15, G01N 33/50, G01N 33/566,
A61K 31/00, A61K 38/00, A61K 45/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl' C12N 15/09, C07K 14/435, C07K 16/18, C12N 1/15, C12N 1/21,
C12N 5/10, C12P 21/02, G01N 33/15, G01N 33/50, G01N 33/566,
A61K 31/00, A61K 38/00, A61K 45/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq,
WPI(DIALOG), BIOSIS(DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/A	Toshiyuki Saito et al., "Structure, chromosomal location, and expression profile of EXTR1 and EXTR2, new members of the multiple exostoses gene family", Biochemical and Biophysical Research Communications(1998), Vol.243, No.1, p.61-66	1-8, 14/ 9-13, 15, 16
X/A	Wim Van Hul et al., "Identification of a third EXT-like gene (EXTL3) belonging to the EXT gene family", Genomics(1998), Vol.47, No.2, p.230-237	1-8, 14/ 9-13, 15, 16

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

08.09.00

国際調査報告の発送日

19.09.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

小暮 道明

4B

9358

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P X	Seiichi Kobayashi et al., "Identification of a receptor for Reg (Regenerating Gene) protein, a pancreatic β -Cell re-generation factor", The Journal of Biological Chemistry (April 14, 2000), Vol. 275 , No. 15 , p. 10723-10726	1 - 1 6